

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

“ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES TERAPEÚTICAS
DEL MUCILAGO DE *Opuntia ficus-indica* MILL. CON
UN MODELO EXPERIMENTAL DE GASTRITIS
INDUCIDA CON LA ADMINISTRACIÓN DE ETANOL
A RATAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A :
BIOL. RICARDO ANTONIO VAZQUEZ RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ

MEXICO, D. F.

ABRIL, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 03 de noviembre del 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Vázquez Ramírez Ricardo Antonio**, con número de cuenta 81105829, con la tesis titulada: **"Análisis de las propiedades terapéuticas del mucílago de Opuntia ficus-indica Mill. con un modelo experimental de gastritis inducida con la administración de etanol a ratas"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Rolando Hernández Muñoz**.

Presidente:	Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón
Vocal:	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Secretario:	Dr. Rolando Hernández Muñoz
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dra. Guadalupe Palomino Hasbach

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de marzo de 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Dra. Guadalupe Palomino Hasbach

Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz por permitirme desarrollar mi trabajo de investigación bajo su dirección y haberme brindado todas las facilidades y apoyo.

De forma muy especial a la Dra. Guadalupe Palomino Hasbach por la revisión y sugerencias que hizo durante el desarrollo de esta tesis, las cuales fueron muy valiosas, en especial por las atenciones para mí y mi trabajo.

A la Dra. Ma. Cristina Pérez-Amador Barrón por la revisión y sugerencias que hizo a lo largo del trabajo de investigación.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García y al Dr. Manuel Jiménez Estrada por la revisión y sugerencias que hicieron a este trabajo.

Al M.I.B.B Gustavo Ortega Lule y al Biol. Giovani Mendoza por el apoyo prestado para el desarrollo de los modelos moleculares.

Al Ing. José Luis Villarreal y al Ing. Omar Hernández por las facilidades prestadas para el desarrollo de los modelos moleculares, en el departamento de Visualización de la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, UNAM.

A la M. en C. Marisela Olguin Martínez, al Biol. Francisco Montiel Ruiz, al M en C. Ricardo Hernández Avila, al M. en C. Javier Martínez y a la Dra. Claudia Lerma González, por el apoyo técnico prestado para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

De forma muy especial a mi hermana Lucía quién estoy seguro que saldrá adelante.

A mi mamá, a Rosa, Carmén, Ramón, Blanca, Diego, Verónica, Leticia por ser personas especiales para mí, sin las cuales no me habría aventurado a hacer este trabajo.

ÍNDICE

Cap.		Pág.
	Resumen -----	-
	Abstract -----	-
	Abreviaturas -----	-
1	Introducción -----	1
1.1	Mucílago -----	3
1.2	Estructura Molecular del mucílago -----	6
1.3	Modelo Molecular del mucílago -----	10
1.4	Gastritis -----	13
1.5	Factores que Afectan la Barrera de la Mucosa Estomacal ----	18
1.6	Citoprotección -----	21
2	Hipótesis -----	25
3	Objetivo -----	25
3.1	Objetivos Específicos -----	25
4	Material y Métodos -----	26
4.1	Obtención del Mucílago -----	26
4.2	Liofilización del Mucílago -----	26
4.3	Modelo Animal. Generación de gastritis -----	27
4.4	Histología -----	27
4.5	Fraccionamiento Subcelular de la Mucosa Gástrica -----	28
4.6	Procedimientos Analíticos -----	29
4.7	Modelo de la Estructura Molecular -----	29
4.8	Análisis de Datos -----	33
5	Resultados -----	34
5.1	Histología -----	34
5.2	Ensayos Bioquímicos -----	39
5.3	Modelo Molecular -----	43
5.3.1	Efecto de los carboxilatos en fase gaseosa -----	44
5.3.2	Efecto del Ca ²⁺ -----	46
6	Discusión -----	51
6.1	Histología -----	51
6.2	Parámetros Bioquímicos -----	54
6.3	Modelo Molecular -----	60
7	Conclusiones -----	66
8	Referencias -----	68

RESUMEN

La información etnobotánica y las propiedades fisicoquímicas del mucílago de *Opuntia ficus-indica* permiten suponer que posee efecto terapéutico al aplicarlo a una mucosa gástrica dañada. Para analizar lo anterior, se utilizó un modelo de gastritis subcrónica, originada en ratas mediante la administración de etanol.

La gastritis subcrónica se evidenció histológicamente por la perturbación de la superficie epitelial, pérdida de células especializadas (fóvea), edema de la submucosa, caracterizado por la presencia de neutrófilos. Las ratas que además recibieron mucílago, manifestaron una restauración más rápida en todos estos parámetros, presentando una disminución del 41% en el número de neutrófilos infiltrados. Los hallazgos bioquímicos indicaron; un incremento en el contenido de colesterol, alteración en la relación de especies de fosfolípidos y de la relación colesterol/fosfolípidos de las membranas plasmáticas, eventos que indicaron una disminución en la fluidez de la membrana por efecto del etanol. Al aplicar el mucílago ocurrió un aumento en la velocidad de reversión de estas alteraciones.

La administración de etanol también originó una disminución en la actividad de la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa. Al suspender la administración de etanol su actividad fue constante, estableciéndose la condición normal únicamente con la administración del mucílago.

Finalmente, el modelo molecular del mucílago y la capa de fosfolípidos desarrollados, permitieron determinar la forma en la que se estabiliza el mucílago y los tipos de interacciones que pueden ocurrir entre el mucílago y los fosfolípidos de las células epiteliales, permitiendo explicar los mecanismos moleculares que originan la acción terapéutica del mucílago.

ABSTRACT

The ethnobotanical information and physicochemical properties of *Opuntia-ficus-indica* mucilage allow us to suppose that it possesses therapeutic effect if it is applied to gastric mucosal injury. To analyze the above, a model of subchronic gastritis was used. The subchronic gastritis was produced in rats by ethanol administration.

The histological findings showed a subchronic gastritis in rats that received ethanol, these findings consisted in epithelial surface alterations, pit cells loss of fovea, submucosa edema characterized by neutrophil cells infiltration. The rats that additionally received treatment with mucilage, manifested a rapid restoration in all these parameters, in particular they had a decrease in neutrophil cells infiltration (41%) regarding the rats that didn't receive mucilage. The biochemical evidences consisted in; increment in cholesterol content, alteration in relationships of phospholipids species and cholesterol/phospholipids of plasmatic membranes, this suggested that membrane fluidity was reduced by ethanol treatment effect. The restoration ratio increased by mucilage administration by all these parameters. Besides, the ethanol administration also produced a decrease in alcohol dehydrogenase activity. When the ethanol administration was suspended the alcohol dehydrogenase activity was high and constant, only settling down to normal condition by mucilage treatment.

Finally, the molecular models of mucilage and phospholipids layer allowed us to know the molecular interactions that involve the mucilage stabilization, the interactions kinds between mucilage and phospholipids layer of epithelial cells, and allowed to explain as the mucilage carries out their therapeutic action.

ABREVIATURAS

ADH	Enzima alcohol deshidrogenasa
ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ARH ₂	Antagonistas del receptor H ₂ de histamina
AM1/SM2	Austin Model 1/ Solvation Model 2
ARN	Ácido ribonucleíco
ADN	Ácido desoxiribonucleíco
Ca ²⁺	Calcio
FS	Fosfatidilserina
FC	Fosfatidilcolina
FI	Fosfatidilinositol
FE	Fosfatidiletanolamina
HCl	Ácido clorhídrico
K ⁺	Potasio
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
Mg ²⁺	Magnesio
Na ⁺	Sodio
NAD	Adenína-dinucleótido de nicotinamida
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
RMN	Resonancia magnética nuclear

1. INTRODUCCIÓN

Las cactáceas, al igual que otras plantas, presentan procesos metabólicos que dan origen a la formación de compuestos orgánicos muy diversos. De hecho las cactáceas producen néctares, gomas, mucílagos entre otras sustancias, las cuales son utilizadas con fines alimenticios, cosméticos o terapéuticos [1].

El uso de plantas con fines terapéuticos en el territorio de México se remonta a tiempos prehispánicos cuando tuvieron gran desarrollo prácticas curativas en las que se utilizaban plantas o sus componentes, como se señala en el “Código Badiano”, (1552) o “Historia de Sahagún”, (siglo XVI) [2]. Las cactáceas al igual que otras plantas que se distribuyen en México, han sido utilizadas con fines terapéuticos por las propiedades curativas que se les han atribuido de manera empírica y que en muchos casos se ha demostrado su eficacia a través de analizar los principios activos. Sin embargo, mucho de este conocimiento suele perderse por el desconocimiento o desprecio por parte de la medicina occidental. Estudios poblacionales señalan que en México de 15 a 20 millones de personas han utilizado la medicina tradicional [2], el mismo número de personas realizan éstas prácticas medicas en otros países, únicamente en Sudáfrica se reporta la utilización de aproximadamente 700 especies de plantas con estos propósitos [3]. El enfatizar la importancia del uso de las plantas en la medicina tradicional no significa un interés particular por desenterrar conceptos y prácticas terapéuticas poco usuales desde la perspectiva de la medicina occidental, sino más bien es el utilizar aquel conocimiento que empíricamente ha demostrado su eficacia y promover su utilización si es que realmente posee efectos terapéuticos.

Diversas especies de cactáceas, siguen siendo utilizadas como remedios, por los que practican la medicina tradicional. Existen diversos padecimientos para los cuales se señala el uso de cactáceas como agente terapéutico dentro de los que destacan: las inflamaciones musculares, dolores reumáticos, fracturas, constipación intestinal, diarrea, úlceras gástricas, diabetes y alteraciones cardiovasculares [1].

Algunas de las formas de aplicación consisten en hacer rebanadas del nopal (cladodio), calentarlas en un comal o a las brazas y aplicar la rebanada superficialmente sobre la inflamación o el área con dolor, esto con la finalidad de disminuir dolores reumáticos o para aliviar procesos inflamatorios. Se señala una propiedad laxante del mucílago de algunos nopales al ingerirlo. Entre la población rural de la parte central de México, es frecuente el uso del mucílago extraído de diversas especies como *Opuntia robusta*, *O.streptacantha*, *O.ficus-indica* y *O.tomentosa* para aliviar constipaciones intestinales [1,4]. En Sudáfrica los cladodios frescos los cortan longitudinalmente y se aplican como cataplasma, o se calientan para cubrir la superficie de la piel que ha sufrido una herida o presenta procesos inflamatorios [3].

A través del mundo, pero especialmente en zonas tropicales y subtropicales, se utilizan plantas suculentas que liberan fácilmente el mucílago de sus tejidos. El mucílago de algunas plantas se ha estudiado desde el punto de vista farmacológico y se ha encontrado que posee actividad terapéutica en contra de algunas enfermedades. En general, se le atribuyen efectos benéficos en contra de quemaduras, irritación, úlceras, irritación, e inflamación interna y externa [5]. En la medicina herbolaria *Opuntia ficus-indica* ha sido utilizada ampliamente en contra de heridas, edema e indigestión. Los

cladodios de *O. ficus-indica* se cortan y se calienta en agua y la infusión es ingerida o aplicada sobre la irritación e inflamaciones de la piel [5].

Estudios *in vitro* señalan que extractos de *Opuntia streptacantha* son capaces de inhibir la replicación viral intracelular e inactivar los virus extracelulares, indicando una capacidad de inhibir la replicación viral tanto en el pre y post tratamiento infeccioso. Dentro de los virus inhibidos destacan el virus del herpes simple, virus del herpes equino, virus pseudorabies, virus de la influenza y virus sincicial respiratorio [6].

Estudios farmacológicos de extractos de *Opuntia ficus-indica*, indican efecto analgésico y protector sobre la mucosa estomacal de ratas. El efecto analgésico se considera que es equiparable al de la aspirina, al aplicarse a ratones a los que se les indujo irritación con ácido acético. De igual forma, estudios con extractos aplicados a ratones demostraron una reducción en lesiones gástricas originadas por la administración de etanol (al 60% en 150 mM de HCl) de manera dependiente de la dosis aplicada [7].

1.1 Mucílago

El mucílago de las Cactáceas es un heteropolisacárido con alto peso molecular, constituido por aproximadamente 30,000 monosacáridos [8]. Los polisacáridos (del griego: *sacaron*, azúcar) son los componentes esenciales de todos los organismos vivos, siendo las moléculas biológicas más abundantes. La unidad básica de los carbohidratos son los monosacáridos, y estos son los componentes principales de los ácidos nucleicos, así como de lípidos complejos y pueden unirse a proteínas, formando glicoproteínas. Pueden tener funciones estructurales, regulatorias y de reconocimiento intermolecular. Los polisacáridos consisten de muchas unidades de monosacáridos unidos covalentemente, presentando una masa molecular en un intervalo de magnitud de millones de daltons [9].

En el "Polymer Science Dictionary" se define al mucílago como la mucina del reino vegetal, por poseer propiedades fisicoquímicas y reológicas, similares a estas glicoproteínas, que recubren y protegen los epitelios en los mamíferos [10]. Funcionalmente, las pectinas están implicadas en procesos de adhesión intercelular en la lámina media de la pared celular, controlando la porosidad de la pared, formando películas en los espacios aéreos y controlando la respuesta estructural ante fluctuaciones en el pH por cationes [11]. El mucílago está contenido dentro de células vesiculares del parénquima y puede contribuir a evitar la congelación de la planta y a curar heridas en las hojas y tallos [11]. Algunos géneros de cactáceas se caracterizan por presentar canales o conductos mucilaginosos en sus tubérculos dónde almacena el mucílago. El contenido de mucílago es variable en las plantas, en *O.ficus-indica*; se ha determinado que se presenta en un intervalo de 1.09 a 4.53% del peso neto [1,12].

La composición química del mucílago de *Opuntia spp.* ha sido objeto de estudio. La mayoría de estos se realizaron en *O.fulgida* [13,14], *O.dillenii* [15], *O.aurantiaca*, *O.brasiliensis* [16] y *O.ficus-indica* [17-21]. El mucílago es moderadamente ácido con un pKa de 4.85 y está formado en la mayoría de las especies por α -L-arabinofuranosa (abarinosa), β -D-galactopiranososa (galactosa), β -L-ramnopiranososa (ramnosa) y ácido α -D-galactopiranosilurónico (ác. galacturónico) [22].

El análisis elemental del mucílago de *O.ficus-indica* revela la presencia de 42.57% de carbono; 6.31% de hidrógeno, 51.2% de oxígeno; 0.022% de calcio y 0.013% de magnesio. El no presentar nitrógeno o azúfre indica la ausencia de aminoácidos. A partir del análisis elemental, se considera que la fórmula molecular es $(\text{CH}_2\text{O})_n$ junto con Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se informan pesos moleculares discordantes para el mucílago, siendo estos de

4.3×10^6 determinado por estudios de sedimentación y en disolución tanto en 20 mM de Tris-HCl, pH 7.4, en la presencia de 10 mM de Na^+ o 10 mM de Ca^{2+} [23]. Estudios más recientes indican pesos moleculares de 13.3×10^6 , determinado mediante dispersión de luz [12] y de 2.3×10^4 , determinado mediante cromatografía de líquidos (HPLC). En este último trabajo se señala que las diferencias en los pesos moleculares pueden deberse a las técnicas de aislamiento y a que el mucílago pudiera estar contaminado con compuestos de la pared celular [24].

Las dimensiones de la molécula, en su forma más compacta (a pH 7.4 y 100 mM de cloruro de calcio) se ha calculado por transmisión de luz, presentando una longitud de 2,940 Å y se considera que tiene una forma alargada [23].

Las plantas de zonas áridas y semiáridas están sometidas a condiciones de estrés hídrico importante y se considera que el mucílago tiene un papel substancial en la adaptación de las cactáceas a estas regiones. Debido a su gran capacidad de acumular y regular el agua, puede contribuir a evitar la congelación de la planta y a la recuperación de heridas en las hojas y tallos [10]. Sin embargo, la capacidad de acumular agua puede ser modificada por efecto de variaciones en el pH de las células de las cactáceas, la composición de sacáridos y la variación en la concentración de cationes como Ca^{2+} y Mg^{2+} . La viscosidad aumenta en presencia de Ca^{2+} o Mg^{2+} . Cambios en el ambiente también influyen en la viscosidad, aclimatación a temperaturas bajas o estrés hídrico produce un aumento de la viscosidad del mucílago, mientras que en época de lluvias origina menor viscosidad [25]. La capacidad de hidratación parece residir en los arabinogalactanos del mucílago y en la proporción de ramnosa y ácido urónico; donde la ramnosa contribuye al carácter hidrofóbico y el ácido urónico al hidrofílico [22].

La presencia de monosacáridos con carga negativa (galacturonatos) a lo largo de la cadena principal del mucílago corresponde a un polielectrolito. Los electrolitos son sustancias que al disolverse en agua forman disoluciones que conducen la corriente eléctrica. Cuando un compuesto iónico, como el mucílago, se disuelve en agua, se destruye la red tridimensional de iones en el sólido y se separan los cationes de los aniones [26].

Por ser un polielectrolito y presentar estereoregularidad en sus cargas aniónicas a lo largo de la cadena principal, puede permitir la formación de complejos con cationes como el Ca^{2+} o asociaciones con moléculas de agua. Esto es un factor que puede influir sobre el arreglo estructural que adquirirá la molécula, incidiendo en sus propiedades dinámicas, actuando sobre algunas características físicas macroscópicas como la viscosidad y la forma en la que esta se modifica. De tal manera, sus propiedades adhesivas, de crioprotección, y los mecanismos mediante los cuales es capaz de regular o almacenar agua en las plantas modulan de forma especial sus efectos citoprotectores sobre el epitelio estomacal [27].

1.2 Estructura Molecular del Mucílago

El mucílago obtenido de los cladodios de *Opuntia ficus-indica* se ha investigado a través de técnicas denominadas de hidrólisis ácida. De la degradación parcial del mucílago se han reportado los oligos- y monosacáridos que lo constituyen y por medio de cromatografía, se ha determinado la composición y tipos de enlaces que conforman los oligosacáridos [19-21]. El resultado muestra que el mucílago está constituido de cinco diferentes monosacáridos en total, siendo estos: el ácido α -D-galactopiranosilurónico, β -L-ramnopiranososa, β -D-galactopiranososa, β -D-xilopiranososa y α -L-arabinofuranosa [21].

El esqueleto del mucílago está formado por los residuos de ácido 1,4- α -D-galactopiranosilurónico y 1,2- β -L-ramnopiranososa, unidos entre sí, en forma alternada y en una proporción de 1:1, aproximadamente [20].

Las cadenas laterales presentan β -D-galactopiranososa, α -L-arabinofuranosa y β -D-xilopiranososa. La β -D-galactopiranososa se une al esqueleto por un enlace 1-4 y entre sí, por enlaces 1-6. Por su parte α -L-arabinofuranosa y β -D-xilopiranososa constituyen las ramificaciones, siendo los monosacáridos que presentan la mayor variación en el mucílago, al variar en número y tipo de ambos residuos (figura 1). La α -L-arabinofuranosa se une a β -D-galactopiranososa con enlaces 1-3 o 1-4. El residuo terminal corresponde a β -D-xilopiranososa, ésta se une a α -L-arabinofuranosa por enlaces 1-5 [21].

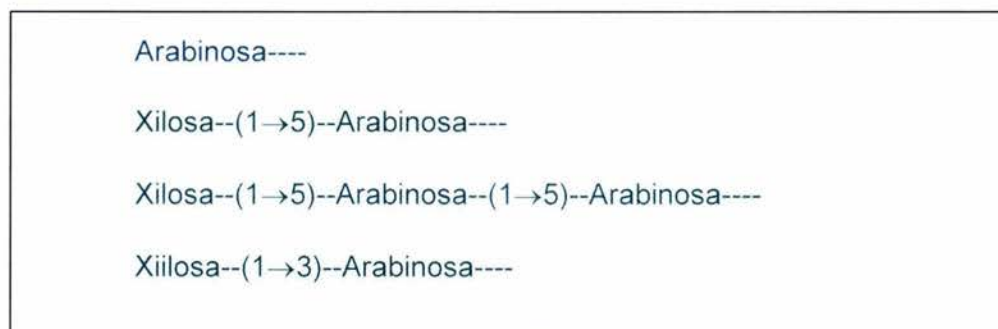


Figura 1. Monosacáridos que forman las cadenas laterales del mucílago de *O. ficus-indica*.

La composición y proporción de monosacáridos del mucílago de *Opuntia*, varía dependiendo de la especie. Al comparar los resultados de la hidrólisis ácida del mucílago de *O.monacanthae*, *O.nopalea-coccinillifera*, *O. auriantica* y *O.brasiliensis* se encuentra características similares en la composición de monosacáridos del esqueleto y en las

cadena laterales, así como en los enlaces entre residuos, aún cuando la proporción de monosacáridos varía [20].

Con base en los resultados obtenidos con el análisis de hidrólisis ácida y metilación [19-23] del polímero degradado, se propone la estructura molecular mínima representada en la figura 2, del mucílago de *O. ficus-indica*.

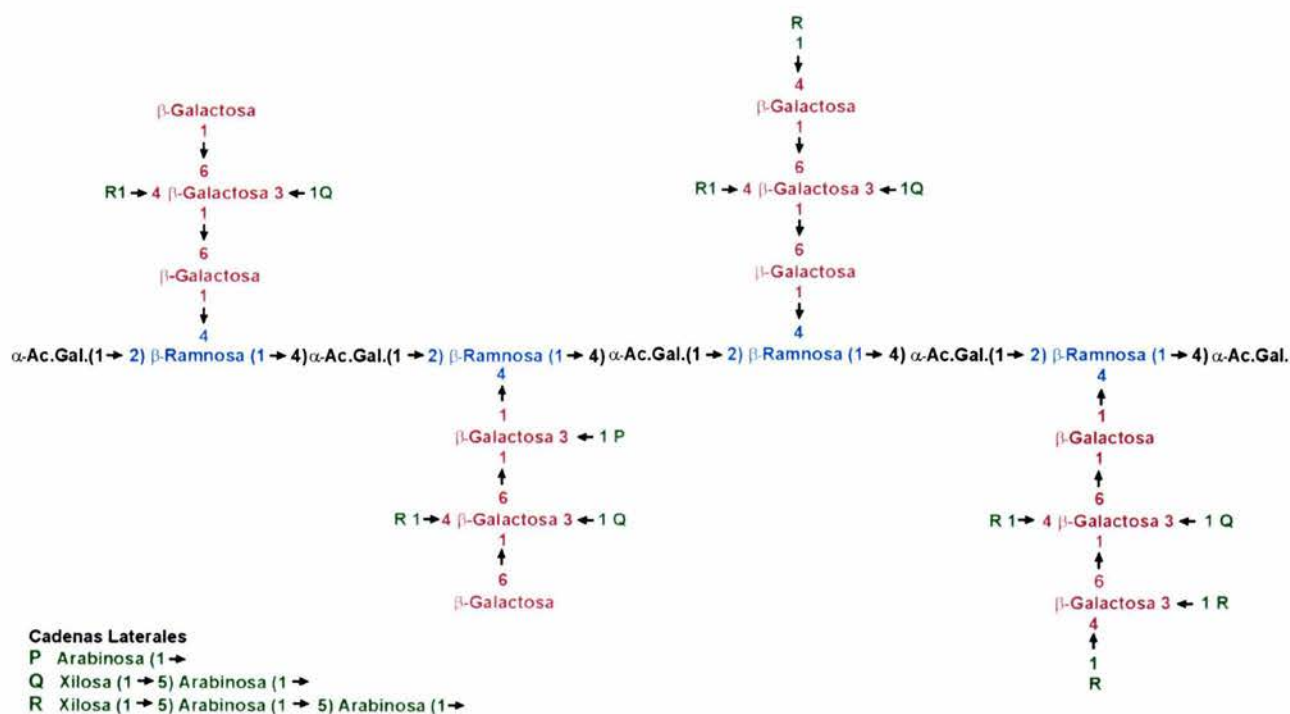


Figura 2. Secuencia parcial y conectividades de los monosacáridos del mucílago de *Opuntia ficus-indica*.

Una de las características físicas más relevante del mucílago es su viscosidad, las cuales están determinadas por las fuerzas intermoleculares entre los grupos funcionales del polisacárido, mismas que permiten la atracción y cohesión entre las moléculas. Las fuerzas intramoleculares son más fuertes que las intermoleculares, sin embargo, estas últimas, tienen gran influencia sobre propiedades físicas macroscópicas como el punto de fusión, ebullición, adherencia o la viscosidad [26].

La viscosidad es una propiedad física de los líquidos y es una medida de la resistencia de los líquidos a fluir. Cuanto mayor es la viscosidad, más lento es el flujo del líquido. La viscosidad de un líquido casi siempre disminuye con el aumento de la temperatura. Los líquidos con fuerzas intermoleculares fuertes tienen mayor viscosidad que los que tienen fuerzas intermoleculares débiles. El agua tiene mayor viscosidad que muchos otros líquidos que poseen un peso molecular cercano y esto se debe a su capacidad para formar puentes de hidrógeno. En general, todas las sustancias que tienen elementos como el hidrógeno, oxígeno o nitrógeno (al igual que el mucílago y las mucinas), son capaces de formar puentes de hidrógeno y presentan la tendencia a entrelazar sus moléculas más que a deslizarse, como lo hacen moléculas de los líquidos con menor viscosidad. Esto permite suponer una tendencia a asociarse y de esta forma adherirse a moléculas adyacentes [26], como podría ser la capa de fosfolípidos de la membrana celular.

Los electrólitos como el mucílago, son sustancias que al disolverse en agua forman disoluciones que conducen la corriente eléctrica y una característica de estos es que en disolución acuosa el soluto se disocia en sus iones (anión y catión). El agua es una molécula eléctricamente neutra, sin embargo es un disolvente muy eficiente de compuestos iónicos, debido a que tiene una región electropositiva (hidrógenos) y una electronegativa (oxígeno). Estas regiones positiva y negativa, propician que el agua sea un disolvente polar muy eficiente. Cuando un compuesto iónico, como el mucílago, se disuelve en agua, se destruye la red tridimensional de iones en el sólido y se separan los cationes de los aniones, y cada catión es rodeado por varias moléculas de agua con su polo negativo orientado hacia el catión. De forma similar, cada anión (carboxilatos de los galacturonatos del mucílago) es rodeado de varias moléculas de agua con su polo positivo

orientado hacia el anión. El proceso en el que un ión es rodeado por varias moléculas de agua orientadas en una forma específica se denomina hidratación (genéricamente solvatación). La hidratación ayuda a estabilizar los iones en disolución y evita que los cationes se combinen con los aniones, incidiendo de manera importante en la estructura que puede adquirir el mucílago y con ello en las propiedades fisicoquímicas [26].

Los polisacáridos iónicos como el mucílago, exhiben propiedades fisicoquímicas particulares por efecto de ser polielectrolitos, pero además el presentar estereoregularidad en sus cargas formales a lo largo de la cadena principal (i.e. ácido galacturónico y ramnosa), propicia que su arreglo estructural se afecte de forma más importante en presencia de iones divalentes como el Ca^{2+} y/o agua. Este fenómeno incide en sus propiedades dinámicas, siendo esto un elemento importante que permite explicar, su viscosidad y el proceso que se lleva a cabo para que la viscosidad se modifique, sus propiedades adhesivas, de crioprotección, así como los mecanismos mediante los cuales es capaz de regular agua en las plantas o generar citoprotección del epitelio estomacal [24,27].

1.3 Modelo Molecular del Mucílago

Como se ha señalado, las propiedades moleculares de las sustancias inciden de manera específica en su comportamiento macroscópico de manera que estudiar las propiedades que gobiernan la estabilidad e interacción molecular de una sustancia resulta útil para predecir o explicar su comportamiento. El modelaje molecular implica la generación, visualización, manipulación y predicción del arreglo tridimensional de estructuras moleculares, así como de la obtención de las propiedades fisicoquímicas asociadas [28].

Para estudiar las propiedades moleculares de una sustancia es posible hacer uso de diversas técnicas experimentales que permiten conocer la estructura tridimensional. En este sentido, dos de las técnicas de mayor aplicación por su precisión son la difracción de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN), técnicas que han demostrado su eficacia al permitir estudiar macromoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos, como lo muestra el acervo de estructuras tridimensionales denominado "Protein Data Bank" [29].

Sin embargo, las conformaciones de disacáridos en disolución han sido difíciles de caracterizar experimentalmente. Las aproximaciones mediante RMN han sido limitadas, en parte debido a que no es posible el acoplamiento protón-protón en el enlace glicosídico, lugar que determina en forma importante la conformación que adquirirá la molécula. Así mismo, acoplamientos heteronucleares generan por lo regular señales pobres y difíciles de interpretar y además se presentan pocas señales del tipo efecto nuclear Overhauser a lo largo del enlace glicosídico. Todo lo anteriormente señalado son algunos de los elementos que dificultan identificar conformaciones de disacáridos específicos mediante RMN [30], aún así existen algunos sacáridos que se han resuelto con esta técnica cuando no forman conglomerados (fibras de sacáridos) [31,32].

Los polisacáridos por su naturaleza altamente hidrodinámica, son estructuras muy flexibles y lábiles, esto también dificulta su cristalización en forma de polímeros. Durante el proceso de cristalización, suelen degradarse a nivel de fragmentos o inclusive se descomponen hasta monosacáridos, impidiendo obtener cristales en forma de polisacárido con la calidad suficiente para la difracción de rayos X. Las pectinas similares al mucílago normalmente no cristalizan y únicamente las fibras de homogalacturonan y ramnogalacturonan se ha resuelto su estructura tridimensional mediante difracción de rayos X [32]. Por lo anterior, resulta indispensable el desarrollo de un modelo molecular

frente a la imposibilidad de la cristalización o extracción pura de algunos polisacáridos como el mucílago en su forma de macromolécula. Los métodos teóricos son reconocidos y pueden tener la misma validez que la difracción de rayos X o la RMN, sobre todo si se dispone de la información suficiente y se utilizan con rigor.

Pueden señalarse en forma general dos métodos teóricos; los que consideran la contribución electrónica de los átomos (mecánica cuántica) y los que se basan en la mecánica clásica o newtoniana (mecánica molecular y dinámica molecular). El primero es un método más complejo, permite estudiar un número menor de átomos y requiere más tiempo de cómputo, mientras que la mecánica molecular permite el manejo de un número mayor de átomos y requiere menor tiempo de cómputo, aunque el modelo puede considerarse más simple. En cualquier caso, existe una asociación entre las coordenadas tridimensionales, representadas como coordenadas cartesianas (x , y , z) de cada átomo, las cuales generan un arreglo molecular que se denomina conformación, mismo que se asocia con una energía potencial, y ante un cambio en el arreglo en el espacio de cualquiera de los átomos originará un cambio en la energía potencial asociada. Se considera que el arreglo espacial que origina la menor energía para un sistema molecular específico, corresponde en el caso de moléculas con actividad biológica al estado nativo, de mayor estabilidad y por lo tanto corresponderá a la conformación biológicamente activa. Por esta razón, es necesario utilizar un método teórico que identifique o explore todas las conformaciones que puede presentar la molécula de interés, indicando la conformación de menor energía. A este procedimiento se le denomina búsqueda conformacional y la conformación de menor energía se denomina global mínimo [28].

1.4 Gastritis

Con base en la información etnobotánica sobre *Opuntia ficus-indica* [1,4,5,8], es posible suponer que el mucílago posee actividad terapéutica contra las alteraciones gástricas, específicamente la gastritis.

El término gastritis significa inflamación de la mucosa gástrica y a pesar de poseer una definición precisa, suele confundirse la sintomatología con otras alteraciones gástricas, particularmente la úlcera o dispepsia. El diagnóstico de la gastritis solo puede ser preciso hasta que se utilizan procedimientos que permiten evaluar el proceso inflamatorio en forma directa, tal como la endoscopia con la toma de biopsia, permitiendo además comprobar las alteraciones histopatológicas que se suceden en los diferentes tipos y grados de gastritis. En la actualidad, la utilización de biopsias para la determinación de gastritis es cada vez menos utilizada, prefiriendo otros procedimientos menos molestos como la laparoscopia, histoquímica o métodos radiológicos; pero la endoscopia no deja de ser la técnica más precisa para establecer el tipo y grado de gastritis [33].

La gastritis puede clasificarse en forma general en aguda y crónica dependiendo del nivel de alteración y sintomatología manifestada; sin embargo el tratamiento para ambas puede ser similar, consistiendo en eliminar la causa que la origina y aplicando algún agente terapéutico, los cuales en su mayor parte están destinados a reducir, neutralizar o inhibir la producción de ácido (HCl). Los fármacos de elección más usuales son: inhibidores de la bomba de protones (omeprazole, lasoprazole), antagonistas del receptor H₂ histaminérgico (cimetidina, ranitidina o famotidina), citoprotectores (sucralfato o prostaglandinas) y cuando la gastritis es de origen bacteriano, por *Helicobacter pylori*, es

necesario también aplicar antibióticos. El efecto esperado es proteger a la mucosa de daño progresivo y propiciar la regeneración celular del epitelio gástrico [34].

Desde la demostración de Spalanzani en el siglo XVII, de que el jugo gástrico tenía la capacidad de digerir el alimento se ha tratado de explicar como se produce el ácido estomacal y como se evita la autodigestión. El ambiente ácido del estómago es esencial para la digestión de los alimentos y el pH en la luz del estómago normalmente es de 1.0, y en las células parietales de la mucosa gástrica de mamíferos es aproximadamente de 7.4. Esto representa un gradiente de pH a través de la membrana celular de la mucosa de 6.4, que constituye el mayor gradiente transmembranal para las células eucariontes. Este gradiente se debe mantener constante en el estómago para que se lleve a cabo la digestión de los alimentos, sin que ocurra la autodigestión; es decir, la fragmentación de proteínas y macromoléculas que conforman las células y órganos en su cercanía [35]. El gradiente se mantiene gracias a un mecanismo llevado a cabo por la ATPasa- H^+ , K^+ (bomba de protón-potasio), la cual utiliza la energía de hidrólisis de ATP para sacar H^+ de las células de la mucosa y verterlo en el lumen del estómago, a cambio de K^+ , por lo que resulta eléctricamente neutro. El K^+ transportado al interior de la célula, se vuelve a sacar por otro sistema que lo cotransporta junto con Cl^- , sistema que por lo tanto es también electroneutro. El resultado neto de estos procesos de transporte, es el movimiento de HCl hacia la luz del estómago durante el proceso de desdoblamiento de los alimentos [36].

Tan importante como determinar los procesos que originan la producción y secreción de ácido a la luz del estómago, es el tratar de elucidar el mecanismo por el cual el recubrimiento gástrico resiste la autodigestión. El concepto de la "barrera de la mucosa gástrica" contra el ácido, introducido por Davenport a mediados de 1960, demostró que el estómago de mamíferos es impermeable al ácido luminal, así como a otros electrolitos,

mientras que los agentes solubles a los lípidos dañan mucho más, debido a que llegan rápidamente al epitelio. Las propiedades de la mucosa estomacal normal, que evitan que los iones de hidrógeno (H^+) lleguen por retrodifusión al lumen de la mucosa son denominadas barrera de la mucosa gástrica. La barrera también evita la difusión de iones de sodio (Na^+) del espacio intersticial al lumen [35].

La resistencia del epitelio al ácido luminal, ha sido demostrada. Se conocen también las propiedades del epitelio como barrera que es capaz de resistir el ácido del estómago y pueden ser atribuidas a varios factores, que incluyen barreras de difusión extracelular y plasmalema contra los protones. La bomba de intercambio de iones que actúa regulando el aumento de la acidificación intracelular del influjo de protones, la capacidad del epitelio superficial para secretar bicarbonato (HCO_3^-) dentro del espacio intersticial y luminal actuando como amortiguador de protones; así como el mantenimiento del flujo de sangre local al epitelio gastrointestinal y el proceso de reconstitución en el cual, las células de mucus indiferenciadas rápidamente migran para cubrir la superficie desnuda [37].

La barrera mucosa está integrada por dos componentes: un estrato de células epiteliales cuyos límites anatómicos no están definidos con precisión, pero que está localizada principalmente en la superficie apical de las células epiteliales superficiales y por encima de ambos se presenta un estrato de mucus que las recubre. El mucus constituye un complejo formado por glicoproteínas, lípidos, agua y bicarbonato (HCO_3^-), siendo las células epiteliales de superficie las responsables de secretar mucus y HCO_3^- [37,38]. La mucosa gástrica y la duodenal se encuentran tapizadas por un revestimiento de mucus, que constituye una barrera de estructura gelode, y proporciona una protección física para la mucosa, obstaculizando la difusión del ácido hacia la superficie de las

células epiteliales. La función de la barrera mucosa es evitar la difusión de iones hacia el epitelio gástrico. Esto es muy importante, porque el gradiente de ácido del estómago es muy grande, lo que confirma que el revestimiento de mucus que recubre las mucosas gástrica y duodenal constituye una protección eficiente en contra de los efectos propios de la pepsina y acidez del jugo gástrico. Sin embargo, durante la gastritis se presentan una serie de alteraciones en el metabolismo del mucus estomacal, en particular ocurren alteraciones en la secreción y síntesis de mucinas [37,38].

Las mucinas son un grupo heterogéneo de glicoproteínas altamente glicosiladas, las cuales son el componente principal que estructura el mucus y que le dan la consistencia en forma de gel [37,38]. Son producidas por varios tipos de células en el tracto gastrointestinal; entre ellas están las células de secreción de mucus en las glándulas del cardias, del fundus y píloro en el estómago y en las glándulas de Brunner en el duodeno, las células copa en el intestino delgado y grueso, así como en las células de secreción de mucus epiteliales [39].

Prácticamente todos los epitelios que están expuestos a un agente extracelular potencialmente nocivo poseen una capa de mucus y el estómago no es la excepción. Esta capa es evidente a simple vista e incrementa su espesor en respuesta a la presencia de irritantes intraluminales, lo que condujo a Beaumont hace 150 años, a señalar que las propiedades de resistencia del estómago en contra del ácido, pueden ser atribuidas a su cubierta de mucus. Se sabe que la capa de gel del mucus, está en el intervalo de espesor de 50-300 μm , el cual es un gel polimérico altamente hidratado, que además de glicoproteínas, presenta carbohidratos y lípidos. Su importancia fisiológica depende en la mayoría de las células epiteliales de la capa luminal superficial y glandular del estómago

así como de las características histoquímicas de su oligosacáridos. Las glicoproteínas representan más del 80% de los constituyentes orgánicos del mucus estomacal, y tienen un peso molecular de 10^6 a 10^7 , y una densidad de carga muy negativa, debido a la presencia de ácido siálico y oligosacáridos sulfatados. Son intrínsecamente viscosas, compuestas de aproximadamente 75% de carbohidratos y 25% de aminoácidos, ligados por enlaces O-glicosídicos entre la N-acetilgalactosamina y residuos de serina o treonina [39]. Desde el punto de vista estructural las mucinas sin oligosacáridos (denominadas apomucinas) o las regiones libres de estas, son insolubles en agua, ya que son los sacáridos los que permiten la hidratación de la molécula y contribuyen principalmente a la formación del gel por ligamiento con el agua y entre mucinas. Las mucinas al estar enlazadas a oligosacáridos adquieren la propiedad de resistir el efecto de las proteasas, adquieren una gran capacidad de almacenar agua. En solución forman agregados macromoleculares por entrecruzamiento a través de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de van der Waals. Con el aumento de entrecruzamiento entre mucinas se produce la formación del gel característico, en donde un número suficiente de polímeros son conectados para formar una red o moléculas poliméricas. Son geles cuyas moléculas son capaces de generar interacciones electrostáticas que pueden aumentar su volumen cientos de veces. Debido a que las mucinas son polianiones, el aumento de volumen depende de efectos de repulsión electrostático de cargas negativas en los polianiones y de interacciones atractivas con cationes libres [39].

La contribución de la glicoproteína del mucus a las propiedades de barrera del estómago es importante y reside principalmente en las propiedades poliméricas relacionadas con la formación del gel de la glicoproteína y su capacidad para atrapar

HCO^{3-} . Esto propicia que las glicoproteínas del mucus actúen como una barrera en contra de la difusión del ácido luminal, reduciendo el gradiente de pH a través del mucus/ HCO^{3-} . Sin embargo, cuando ocurre un desbalance entre la relación secreción de mucus vs secreción de ácido, puede intervenir la siguiente capa protectora que corresponde a elementos lipídicos de la capa de mucus en forma de gel, los cuales ejercen también un efecto protector importante como barrera al ácido luminal, similar a su función como barrera de superficie en muchas células y tejidos como la piel [37].

Dentro de las funciones fisiológicas asociadas a las mucinas destacan la citoprotección, barrera mecánica que estéricamente impide la interacción de proteasas directamente sobre el epitelio, mantener la viscosidad de la secreción y reconocimiento celular [37,38]. Sin embargo, durante la gastritis las mucinas del mucus gástrico son anormales, modificándose la viscosidad y originando una estructura defectuosa del gel y una deficiente producción de N-acetilneuramínico que origina una defensa defectuosa frente al ácido y pepsina [40]. También se ha encontrado que las cantidades de mucina histológicamente apreciables en la mucosa son deficientes, escasas o de consistencia anormal; todo esto conduce a un mayor deterioro de la mucosa gástrica, por incapacidad de evitar el efecto directo de los agentes nocivos sobre el epitelio [39,41].

1.5 Factores que Afectan la Barrera de la Mucosa Estomacal.

Los factores más importantes que afectan la barrera de la mucosa estomacal y que actúan directamente sobre ésta son; factores endógenos como las sales biliares, ácido clorhídrico y pepsinas, y exógenos como; alimentos (con exceso de grasa o sal, muy condimentados o muy calientes), medicamentos (aspirina), estrés, infecciones (*Helicobacter pylori*), etanol, etc. [37].

Cuando esta barrera se daña, se originan muchas alteraciones en la función de la mucosa: por ejemplo, la red de difusión de H^+ dentro de la mucosa y el flujo de Na^+ y K^+ dentro del lumen se modifican, ocurre una disminución en la diferencia de potencial de la mucosa, hay un aumento en la exudación de fluidos, glucosa y proteínas dentro del lumen. Todo esto se acompaña de un aumento en la concentración de histamina en la sangre venosa gástrica [41].

La aspirina con un pKa de 3.5 en el pH bajo del lumen gástrico está en la forma no ionizada, siendo la forma soluble a grasas, por lo que fácilmente cruza la membrana celular. Los ácidos biliares son detergentes naturales que originan lesiones al disolver los componentes lipídicos de la membrana celular. Davenport [42] propuso que, después de que estos agentes son absorbidos, ocurren una serie de eventos fisiológicos, entre los que destaca el aumento de retrodifusión de H^+ dentro de la mucosa. El ácido destruye las células de la mucosa y actúa junto con la pepsina destruyendo la barrera, probablemente a través de la formación de radicales libres que actúan generando lipoperoxidación. La retrodifusión de ácido daña directamente los capilares y con histamina (que es liberada por los mastocitos), origina un edema y proteínas liberadas dentro del espacio extracelular. El resultado es una erosión superficial en la mucosa estomacal. La isquemia por sí sola, no puede romper la barrera, y requiere la presencia de ácido y sales biliares [35].

Las sales biliares, aspirina a pH bajo y etanol a cualquier pH, se difunden dentro de las células epiteliales gástricas e inicialmente causan lesiones internas celulares alterando o no la membrana celular apical. Se ha sugerido que la monocapa intacta de células epiteliales superficiales puede ser responsable de mantener el gradiente de pH

intraluminal normal. La exposición a agentes tópicos que alteren la barrera resulta en una lesión morfológica que incluye exfoliación de las células de mucus de superficie [35].

El efecto del flujo de sangre en la mucosa estomacal es otro factor que influye sobre los procesos de daño y reparación. Se ha demostrado que la isquemia de la mucosa es el principal evento en lesiones inducidas por estrés. Pero la vasoconstricción no es suficiente para romper la barrera de la mucosa gástrica. El ácido, sales biliares e isquemia inducen lesiones en la mucosa gástrica en forma significativa, y al incrementar el flujo de sangre farmacológicamente disminuyen estas lesiones. Fármacos como la aspirina reducen el flujo de sangre basal en la mucosa. Esto puede estar relacionado con la inhibición de síntesis de prostaglandinas endógenas [35].

Por su parte el etanol causa lesiones gástricas a través de un mecanismo común a otros agentes necrozantes como los que se han señalado previamente, sin embargo, se conocen algunos mecanismos específicos correspondientes a la acción del etanol [43]. El etanol, es soluble en agua y en lípidos, así que es absorbido rápidamente tanto a un pH intraluminal ácido como alcalino, alterando las membranas celulares, dañando rápidamente y de manera muy profunda las células epiteliales en todo el estómago glandular de las ratas [42]. Después de la exposición al etanol, la red de flujos de H^+ , Na^+ y K^+ a través de las membranas se reducen, así como la diferencia de potencial transmucosa y se presenta una elevación en el pH intraluminal [44]. Estas alteraciones pueden estar acompañadas de lesiones en la mucosa de naturaleza hiperémica y hemorrágica, visibles macroscópicamente en cuestión de minutos y desde el punto de vista microscópico se pueden presentar discontinuidades en el epitelio de la superficie, erosiones, hemorragias subepiteliales, reducción en la profundidad de la faveola, denudación o adelgazamiento de las células superficiales de la mucosa gástrica. No sólo

se puede presentar una interrupción en la continuidad del estrato mucoso, sino que se rompen uniones estrechas existentes entre células, alterando el estrato lipoproteico de su superficie. Se sugiere que el etanol altera la barrera mucosa permitiendo una mayor retrodifusión de H^+ a través de ella, así como una disminución marcada del estrato mucoso y del contenido de mucinas de las células epiteliales de revestimiento; todo esto está asociado con alteraciones en los flujos de H^+ y Na^+ . La gravedad de las alteraciones es directamente proporcional a la concentración de etanol y a las condiciones de ingesta [37,45].

1.6 Citoprotección

Numerosos eventos bioquímicos y funcionales pueden estar involucrados en la protección de la mucosa. Como los mecanismos de la lesión de la mucosa son multifactoriales, es probable que varios procesos estén involucrando en la protección de la mucosa [39,46].

En general el proceso de curación de la gastritis puede implicar procesos como la disminución de la inflamación, el aumento de la actividad mitótica de las células adyacentes a los bordes libres, la neoformación vascular y la remodelación de la mucosa para restaurar su función normal.

Dentro de los aspectos que inciden sobre la reparación de la mucosa gástrica, destacan la proliferación celular, migración celular, motilidad duodenal, secreción de bicarbonato, inhibición o reducción en la secreción de ácido, liberación de prostaglandinas e integridad o buen funcionamiento de la barrera mucosa que implica secreción de mucinas [37,47].

El término citoprotección se ha aplicado a la prevención de lesiones en la mucosa gástrica [35]. Esta propiedad de proteger la superficie del epitelio de la mucosa gástrica en contra sustancias nocivas tales como el etanol, aspirina, ácido taurocólico, etc., se describió por vez primera para las prostaglandinas [48], después muchas sustancias, incluyendo omeprazol [49], sucralfato, antiácidos [50], así como el factor de desarrollo epidermal, han mostrado tener propiedades en contra del daño producido en la mucosa gástrica [51]. El efecto citoprotector de algunos de los fármacos antes señalados y en particular los antagonistas del receptor H_2 de histamina (ARH_2) ha sido demostrado, al aplicarlos antes de la administración de agentes nocivos, pero no después; lo cual puede dificultar el evaluar la tasa de recuperación del daño [52]. Esto produce una falta de información sobre la posible acción benéfica del fármaco estudiado tanto en parámetros histológicos, como bioquímicos. Por este motivo, se puede obtener más información del probable efecto benéfico del agente citoprotector cuando se administra a un daño gástrico de la mucosa preestablecido [34].

El modelo de gastritis experimental inducida por la administración de etanol a ratas, propuesto por Hernández y Montiel [34] utilizado para analizar las propiedades terapéuticas del mucílago, permite analizar las alteraciones en el ámbito de la membrana plasmática, al determinar el contenido de colesterol membranal, el cambio en la composición de fosfolípidos, alteración en la fluidez de la membrana plasmática y actividad de enzimas citosólicas; alcohol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa. Este modelo permite también evaluar la proliferación celular compensatoria al daño producido por el etanol mediante análisis histológico. Después de originar el daño, las alteraciones son revertidas gradualmente de forma autónoma sin aplicar agente terapéutico y esto se

compara con el proceso de reversión originado por el tratamiento con el agente terapéutico (mucílago).

Los parámetros señalados en el modelo de Hernández y Montiel [34] son útiles si se considera que los fosfolípidos de la membrana celular tienen un papel importante en la barrera protectora del epitelio gástrico, contribuyendo a formar una barrera impermeable contra el ácido luminal y aumentan la viscosidad y fluidez de la capa de mucus, interviniendo al otorgarle integridad y protección como barrera protectora [53]. Se sabe que los fosfolípidos en la membrana celular presentan una distribución asimétrica: en la capa externa predomina fosfatidilcolina y en la interna está formada principalmente de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina [54]. Cuando un agente interno o externo altera el perfil de fosfolípidos, esto puede disminuir la resistencia de la mucosa a agentes tóxicos y a la secreción ácida. El etanol puede dañar la barrera de la mucosa gástrica alterando la composición y la hidrofobicidad de la superficie [55].

Por su parte la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), localizada en el citosol, convierte al etanol en acetaldehído, requiriendo para este proceso de una molécula de nicotinamida adenín-dinucleótido (NAD) como coenzima y el acetaldehído resultante pasa a la mitocondria, dónde es transformada a acetato por medio de la aldehído deshidrogenasa. Ambas enzimas pueden metabolizar hasta el 80% del etanol ingerido, siendo la principal vía de destoxificación de etanol en mamíferos. La ADH se localiza en el hígado, estómago, intestino delgado, pulmones, riñones y ojos [56]. El metabolismo gástrico del alcohol se ha considerado como un agente protector contra los efectos del compuesto, debido a que, al ser oxidado por la ADH gástrica, se disminuyen los niveles de etanol en sangre [57].

La lactato deshidrogenasa (LDH) es otra enzima citosólica; presenta mayor actividad en riñón, para ir disminuyendo su actividad en: corazón, músculo esquelético, páncreas, bazo, hígado, pulmón. La actividad específica de esta enzima aumenta en suero, en procesos de daño, específicamente, aumenta al inicio de un cuadro de hepatitis. La LDH cataliza la reducción reversible del piruvato, en presencia de NADH a lactato. Frente a la acción terapéutica de inhibidores de los receptores H₂ de histamina resultó ser un buen indicador de restauración celular [58,59].

2. HIPÓTESIS

Tomando en consideración las propiedades terapéuticas asociadas al mucílago de *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. en contra de heridas, irritaciones, úlceras, inflamaciones internas y externas en personas que lo utilizan en forma empírica, y considerando las propiedades fisicoquímicas del mucílago, se propone que éste puede tener un efecto citoprotector sobre la mucosa gástrica y de reversión de la gastritis subcrónica originada con etanol.

3. OBJETIVO

Determinar las propiedades de reversión del mucílago de *Opuntia ficus-indica* Mill. sobre las alteraciones estructurales, funcionales y metabólicas que se presentan en la mucosa gástrica, originadas con un modelo experimental de gastritis subcrónica inducida por la administración de etanol a ratas.

3.1 Objetivos específicos:

1. Evaluar histológicamente la eficacia curativa del mucílago.
2. Caracterizar la composición lipídica y de colesterol de la membrana plasmática.
3. Determinar la actividad de las enzimas; alcohol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa como indicadores de la actividad prevaleciente en el citoplasma celular.
4. Modelar la estructura molecular del mucílago a partir de la información impresa y virtual.
5. Establecer una relación entre la estructura química y la actividad biológica del mucílago.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Obtención del Mucílago

Las plantas de las cuales se obtuvo el mucílago fueron colectadas en Milpa Alta, D.F. México, y fueron determinadas mediante claves [1,60] y las plantas correspondieron a la clasificación taxonómica:

Familia Cactaceae Lindley

Subfamilia Opuntioideae Schum.

Tribu Opuntieae (Britt, R.) Backbg.

Género *Opuntia* (Tournefort) Miller

Especie *Opuntia ficus-indica* (Linné) Miller

4.2 Liofilización del Mucílago

El mucílago fue obtenido por liofilización de la secreción de los cladodios de *Opuntia ficus-indica* Mill.

La técnica consistió en lavar y fragmentar 2 kg de cladodios, depositándolos en 1000 ml de agua destilada (relación 2:1), durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo, el líquido sobrenadante se congeló. Utilizando un equipo de liofilización se deshidrató el mucílago, obteniendo de esta forma 40.9 g de mucílago en polvo de color amarillo y de consistencia laminar (hojuelas de 2 mm²). Colateralmente se determinó la presencia de colonias de bacterias u hongos en el polvo de mucílago, descartando los lotes que resultaron positivos. Los lotes libres de bacterias y hongos, se almacenaron al vacío y en refrigeración (5°).

4.3 Modelo Animal – Generación de Gastritis.

Las ratas machos Wistar (240-270 g de peso corporal) se mantuvieron con una dieta de Lab Chow y agua *ad libitum*. Para el pretratamiento, permanecieron en ayuno, con acceso libre durante toda la noche al agua y recibieron intragástricamente 1 ml de solución salina (grupo control) o 1 ml de etanol al 50% por sonda gástrica (grupo de inducción de gastritis). Las ratas se mantuvieron en cajas individuales con acceso libre al agua y alimento (grupo control) o al 5% de etanol en agua y alimento (grupo con gastritis). Este último grupo ingirió de 9-10 g/kg de peso corporal de etanol diariamente. Los pretratamientos se llevaron a cabo por cinco días y al quinto día este se retiró. Se sacrificaron un conjunto de ratas control (n=6) y con gastritis (n=6), con anestesia general con pentobarbital sódico (40 mg/kg peso corporal), 2 hrs después de retirar el etanol (24, 48, 72 hrs). En otro grupo de ratas con gastritis, el mucílago se administró independientemente, después de retirado el etanol como sigue: (1) aquellos que recibieron solución salina intragástrica por uno a tres días (en pares de control y tratado, n=6); (2) ratas (n=6) que recibieron administración intragástrica de mucílago (5 mg/kg/día) por uno a tres días. Correspondiendo a los controles, aquellos que no fueron tratados con etanol (n= 6), después de completar el quinto día, se les aplicó el mismo esquema de administración del mucílago. Después los animales fueron sacrificados por decapitación, bajo anestesia general con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso).

4.4 Histología

Los estómagos se removieron, haciendo una disección a lo largo de la curvatura menor, se lavaron y depositaron en solución salina fría (8° C). Segmentos de la pared gástrica se cortaron a lo largo de la mucosa glandular. Los especímenes se fijaron en

amortiguador de fosfatos conteniendo formalina al 10% y se tiñeron con hematoxilina y eosina, así como con tinción tricrómica de Gomori. Los especímenes de mucosa gástrica se codificaron para el análisis patológico cuantitativo y fueron evaluados con el microscopio de luz y con micrografía seleccionando los 10 mejores campos por cada sujeto de acuerdo con el protocolo de doble ciego.

4.5 Fraccionamiento Subcelular de la Mucosa Gástrica

La mucosa gástrica de las ratas se extrajo completamente y se homogeneizó en un amortiguador conteniendo 0.25 M de sacarosa y 10 mM de Tris-Base (pH=7.5). Para el aislamiento de las membranas plasmáticas se utilizó el método descrito por Loten y Redshaw-Loten [61] para el aislamiento de membranas plasmáticas de hígado. El homogeneizado se centrifugó a 1,500 rpm a 4 °C y el precipitado resultante se resuspendió en el mismo amortiguador, solo agregando Percoll y sacarosa 2 M. Las muestras se centrifugaron a 12,800 rpm a 4 °C durante 25 min y la fracción de membrana plasmática se ubicó en otro tubo conteniendo Percoll y CaCl_2 81.6 nanomolas/litro. Las muestras nuevamente se centrifugaron a 13,500 rpm a 4°C por 15 min y las membranas plasmáticas se colectaron y se mantuvieron para su utilización en refrigeración. La centrifugación secuencial a 8,500 rpm y después a 100,000 rpm a 4 °C, permitió remover la fracción mitocondrial y microsomal. La pureza de las fracciones se evaluó con enzimas marcadoras. El mismo criterio se utilizó para la fracción citosólica, donde la actividad específica de las enzimas alcohol y lactato deshidrogenasa indicaron estar por abajo del 8% de contaminación de otras fracciones subcelulares.

4.6 Procedimientos Analíticos

Para determinar el contenido de fosfolípidos membranales se utilizaron las muestras de membranas plasmáticas depositandolas en cloroformo/metanol (2:1, v/v). El extracto se filtró con papel filtro y se descartó la fase acuosa. Los lípidos contenidos en la fase con cloroformo se depositaron en una capa fina con sílice de cromatografía, corriendo en fase móvil (130 ml de cloroformo, 70 ml de etanol, 5 ml de hidróxido de amonio, 5 ml de agua destilada) para separar los fosfolípidos. Las especies de fosfolípidos se revelaron por exposición a vapores de yodo; las especies de fosfolípidos se identificaron y determinó su contenido de fósforo a 820 nm y fueron cuantificados de acuerdo al método de García-Saínz y Fain [62] y el colesterol por el método colorimétrico reportado por Abell *et al.* [42]. La actividad específica de lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27) se analizó por medio de la técnica de Vassault [59] y alcohol deshidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1) se determinó mediante espectrofotómetro con 650 mmol/litro de etanol como sustrato, con las condiciones descritas por Caballería *et al.*, para el ADH de estómago de rata [63]. En todos los ensayos, el contenido de proteína se cuantificó de acuerdo a Lowry *et al.* [64].

4.7 Modelo de la Estructura Molecular

Con base en los estudios sobre la composición química del mucílago de *O. ficus-indica*, que permiten disponer de información sobre los monosacáridos que lo constituyen y la forma en la que están interconectados [17-23], se propone un modelo simplificado de la estructura tridimensional del mucílago.

Inicialmente se obtuvieron las coordenadas cristalográficas de los monosacáridos que forman el mucílago como; galactosa [65], ácido galacturónico [66], ramnosa [67] y

xilosa [68], mismas que se utilizaron como geometrías de inicio para hacer una búsqueda de conformaciones al rotar los ángulos diedros de los hidroxilos. Con los monosacáridos resultantes se obtuvieron todas las combinaciones de dímeros encontrados en el mucílago y se hizo una búsqueda de conformaciones rotando los ángulos ϕ (formado por los átomos; O5-C1-O4'-C4') y ψ (formado por los átomos; C1-O4'-C4'-C5'), que corresponden a los ángulos del enlace glicosídico (figura 3), esto mediante el método de mecánica cuántica; AM1 (Austin Model 1) implementado en el programa Spartan e instalado en una pentium 4 [69].

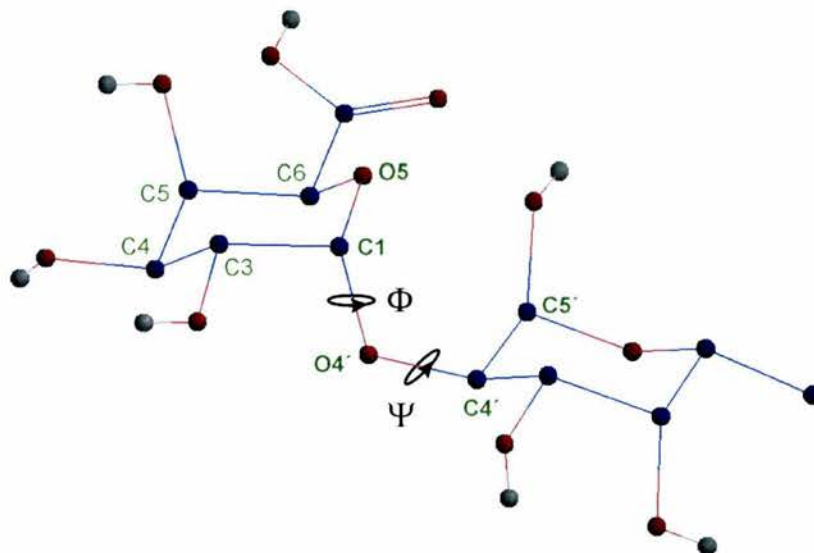


Figura 3. Representación de un disacárido indicando los ángulos de torsión ϕ (O5-C1-O4'-C4') y ψ (C1-O4'-C4'-C5'), así como la numeración de los átomos de acuerdo a la IUPAC. Los átomos de carbono en azul, oxígeno en rojo e hidrógeno en gris..

Mediante la búsqueda de conformaciones, se obtuvieron y seleccionaron las geometrías de menor energía para cada par de ángulos ϕ y ψ de todos los dímeros posibles del mucílago. Estas geometrías se utilizaron para armar la cadena principal

(formada por ácido galacturónico y ramnosa) y las 10 cadenas laterales representadas en el presente modelo simplificado (formadas por combinaciones de xilosa, arabinosa, galactosa), mismas que fueron sometidas a optimizaciones de geometría bajo condiciones que simularon una cubierta de moléculas de agua mediante el método AM1/SM2 (Austin Model 1/ Solvation Model 2) disponible en el programa Spartan y que consiste en una cubierta de moléculas de agua explícitas que rodean al soluto (mucílago) y una segunda capa de agua de tipo no explícito, así como polarización dieléctrica del disolvente [70]. Una vez obtenidas las geometrías de menor energía para la cadena principal y ramificaciones en condiciones de hidratación, estas se unieron entre sí, generando una estructura molecular de inicio del mucílago.

La conformación de menor energía implica la conformación más estable y en los sistemas biológicos generalmente corresponde a la estructura molecular biológicamente activa. Para obtener la conformación de menor energía, se optimizó la geometría de la molécula de inicio, mediante mecánica molecular con el programa InsightII, hasta obtener una conformación en equilibrio en las condiciones similares a las que se encuentra el mucílago; es decir, rodeada de moléculas de agua (4 Å) y en presencia de 5 iones de Ca^{2+} , utilizando un criterio de convergencia de 0.001 kcal/mol.

Una vez alcanzado el equilibrio con las condiciones anteriores y asumiendo que la geometría de menor energía corresponde a la conformación más estable y por lo tanto biológicamente activa, se sometió el modelo del mucílago a diferentes condiciones:

a) Efecto de los carboxilatos.

Los carboxilos de los ácidos galacturónicos pueden presentar cargas negativas (carboxilatos) o neutras (ácidos carboxílicos). Se aplicaron diferentes combinaciones

respecto de las cargas formales (carboxilato vs ácido carboxílico), sobre la cadena principal del mucílago y se optimizaron las geometrías en fase gaseosa y de hidratación, sin iones de Ca^{2+} y se compararon las energías totales.

b) Efecto del Ca^{2+} .

Para evaluar el efecto producido por la formación de complejos iónicos entre los carboxilatos del mucílago con iones de Ca^{2+} , se incluyeron diferentes cantidades de Ca^{2+} , ubicándolos a 5 Å distancia de los carboxilatos, seguido de optimización de la geometría de todo el complejo en fase gaseosa y en fase de hidratación. El mucílago presentó todos los ácidos galacturónicos en forma aniónica y las proporciones de Ca^{2+} fueron de 1 a 5 iones.

Modelo de Membrana Epitelial - Interacción con una capa de fosfolípidos.

Colateralmente, se desarrolló un modelo de fosfolípidos que representara la membrana celular, utilizando para este propósito el modelo bicapa lípidica de 200 fosfolípidos, desarrollado por Heller *et al.* [71]. Este modelo se modificó utilizando únicamente una de las capas de fosfolípidos. Con la finalidad de presentar una composición de fosfolípidos similar a la encontrada en una membrana extracelular de una célula animal, se representaron la siguiente proporción de fosfolípidos: 12.96% de fosfatidiletanolamina, 7.4% de fosfatidilserina, 44.44% de fosfatidilcolina y 35% de esfingomielina, con un total de 104 fosfolípidos [72]. La conformación más estable se obtuvo optimizando la geometría mediante ciclos alternados de 5,000 pasos de dinámica molecular con 5,000 pasos de mecánica molecular, hasta alcanzar el criterio de convergencia de 0.001 kcal/mol con el programa InsightII [73] instalado en una estación

de trabajo Silicon Graphics Onyx Mips R4400 facilitada por la Dirección General de Cómputo Académico, UNAM.

Con el propósito de determinar la forma en la que interactúa el mucílago con la capa de fosfolípidos se asociaron ambas macromoléculas dejando una distancia de 25 Å de separación una de la otra y se optimizó la geometría mediante mecánica molecular hasta obtener la convergencia a 0.001 kcal/mol y 100 picosegundos de dinámica molecular.

Con la información obtenida se analizaron las propiedades hidrodinámicas, y de interacción intermolecular del mucílago con los fosfolípidos.

4.8 Análisis de Datos

Los resultados fueron expresados como medias \pm desviación estandar. Las diferencias entre los grupos correspondientes a los análisis histológico y bioquímico, se evaluaron con un ANOVA de dos colas y se utilizó una prueba de Tukey para comparar las medias mediante el programa Statistica versión 5 en una computadora personal pentium 4.

5. RESULTADOS

5.1 Histología

La figura 4 muestra micrografías de la mucosa gástrica de ratas control, sin gastritis (4a y 4b) y sujetos con gastritis, correspondiendo a las 24 (4c y 4d), 48 (4e) y 72 hrs (4f-4h), después de la administración de etanol. La presencia en el epitelio de la mucosa perturbada o interrumpida en su superficie, pérdida de células especializadas (fóvea), edema ligero de la submucosa e infiltración de leucocitos polimorfonucleares fueron evidentes en las ratas tratadas con etanol (figuras 4c y 4d).

Estas alteraciones se encontraron también después de 72 hrs de administración de etanol; aún cuando el número de PMN infiltrados fueron menos abundantes (figura 4f). La tabla 1 es un resumen del perfil histológico encontrado en ratas tratadas con etanol (grupo con gastritis) y aquellas que además recibieron mucílago. Las ratas que solamente recibieron etanol, presentaron alteraciones evidentes y severas del epitelio superficial e infiltrado inflamatorio en la mucosa gástrica a las 24 hrs (figura 4c y 4d). A las 48 hrs de cesar la administración de etanol, se manifestó una mejoría en la mucosa gástrica; sin embargo, aún a las 72 hrs de la administración de etanol, se observó un patrón de gastritis moderada en estos sujetos (tabla 1 y figura 4f).

El mucílago administrado a las ratas con gastritis fue efectivo en disminuir las alteraciones histológicas, promovió la reducción de las alteraciones de la superficie epitelial, la pérdida de células especializadas de la fovea y el infiltrado de PMN en forma importante desde las 48 hrs (figura 4e) y en forma significativa a las 72 hrs (figuras 4g y 4h). El tratamiento de la mucosa gástrica con mucílago fue efectivo en la reversión de

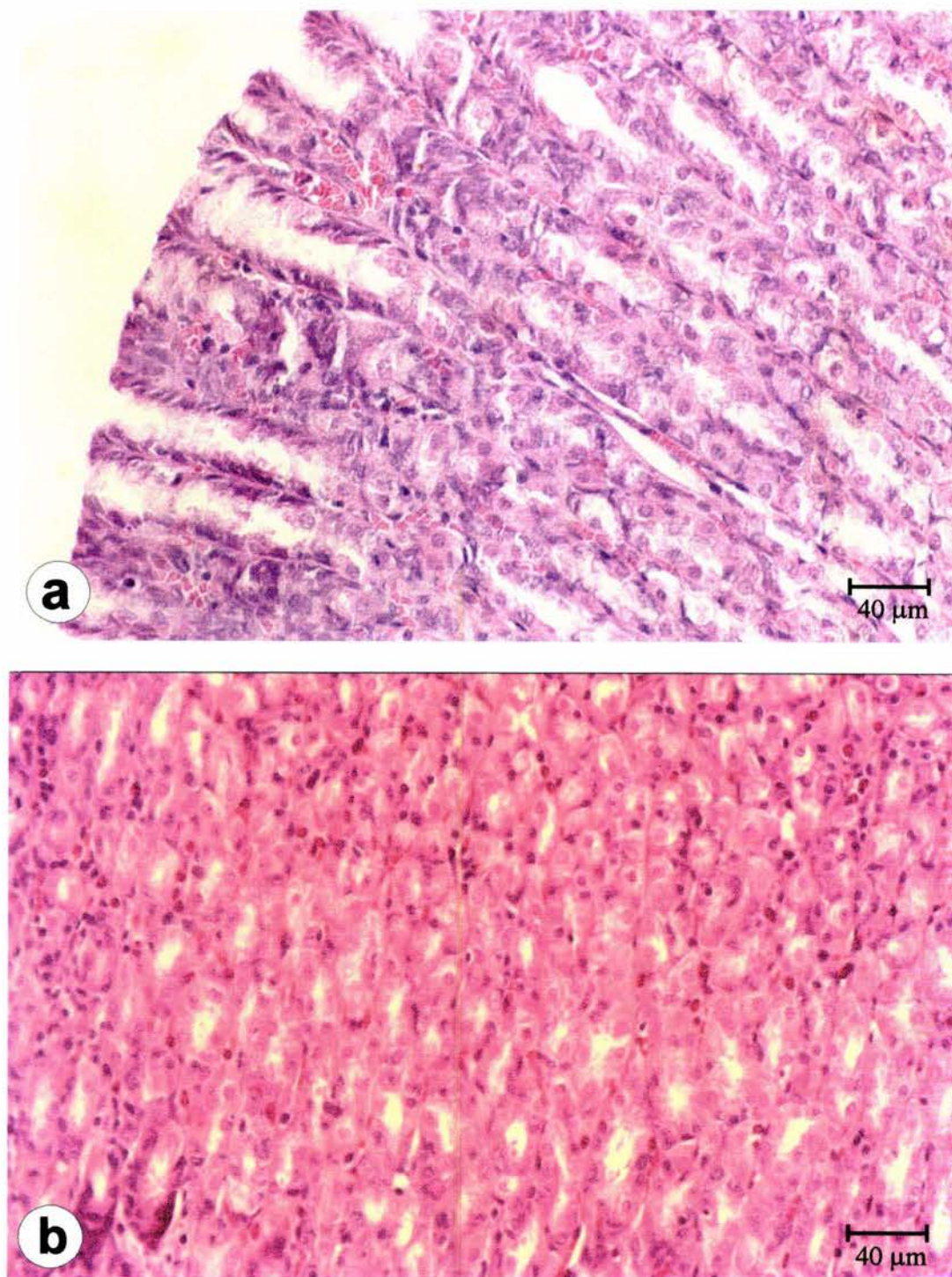


Figura 4 a-b. Micrografías de la mucosa gástrica de ratas sin gastritis. Se tiñó con hematoxilina-eosina y se utilizó el objetivo 40x.

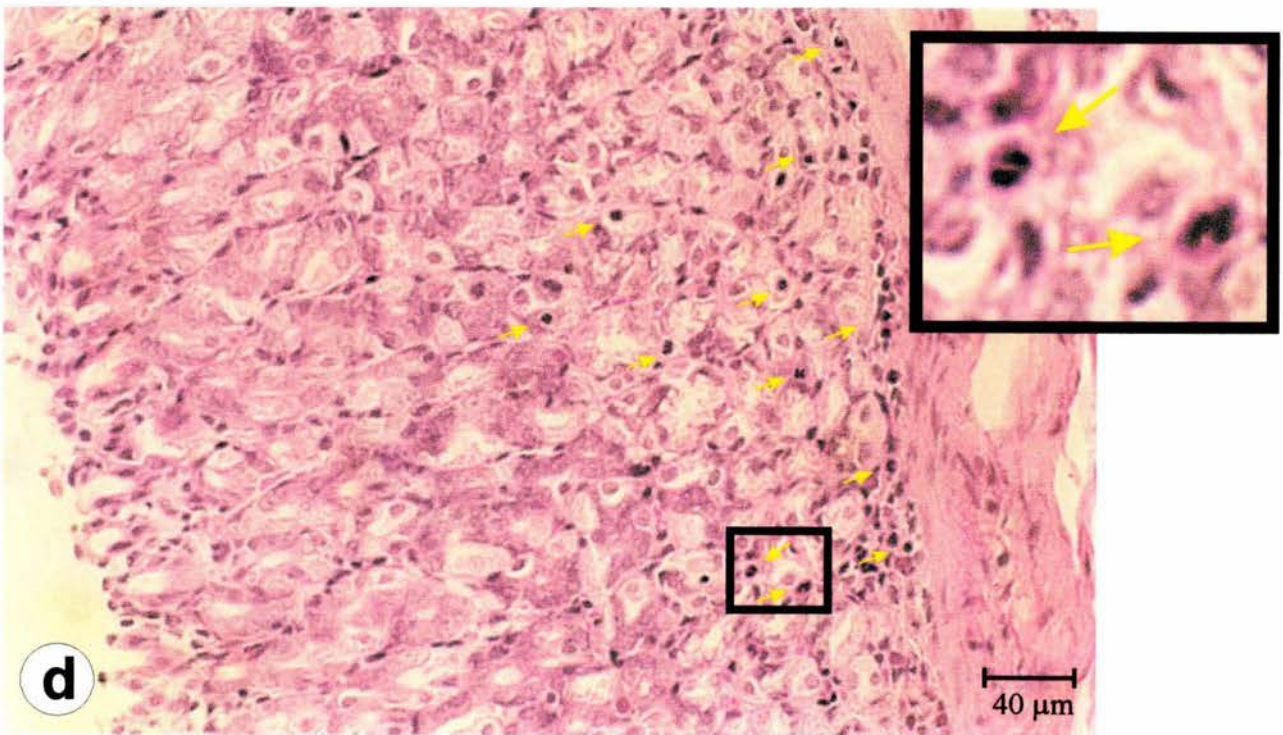
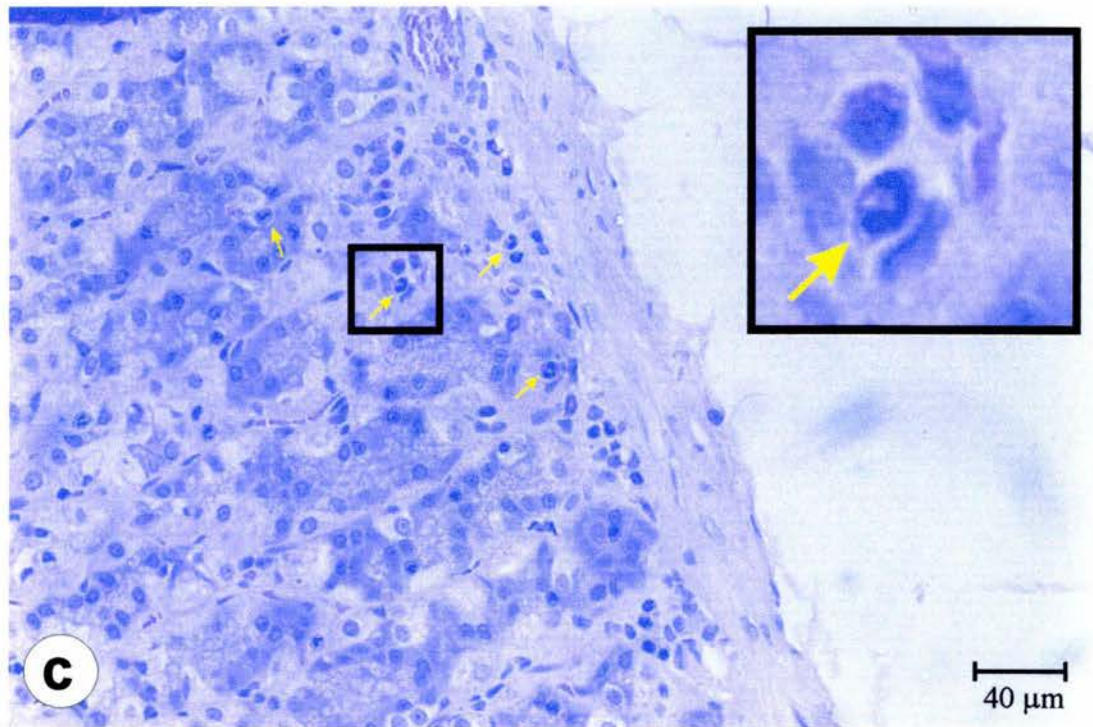


Figura 4 c-d. Micrografías de la mucosa gástrica de ratas con gastritis (24 hrs), las ampliificaciones y flechas señalan los polimorfonucleares. Se tiñó con hematoxilina-eosina y se utilizó el objetivo 40x.

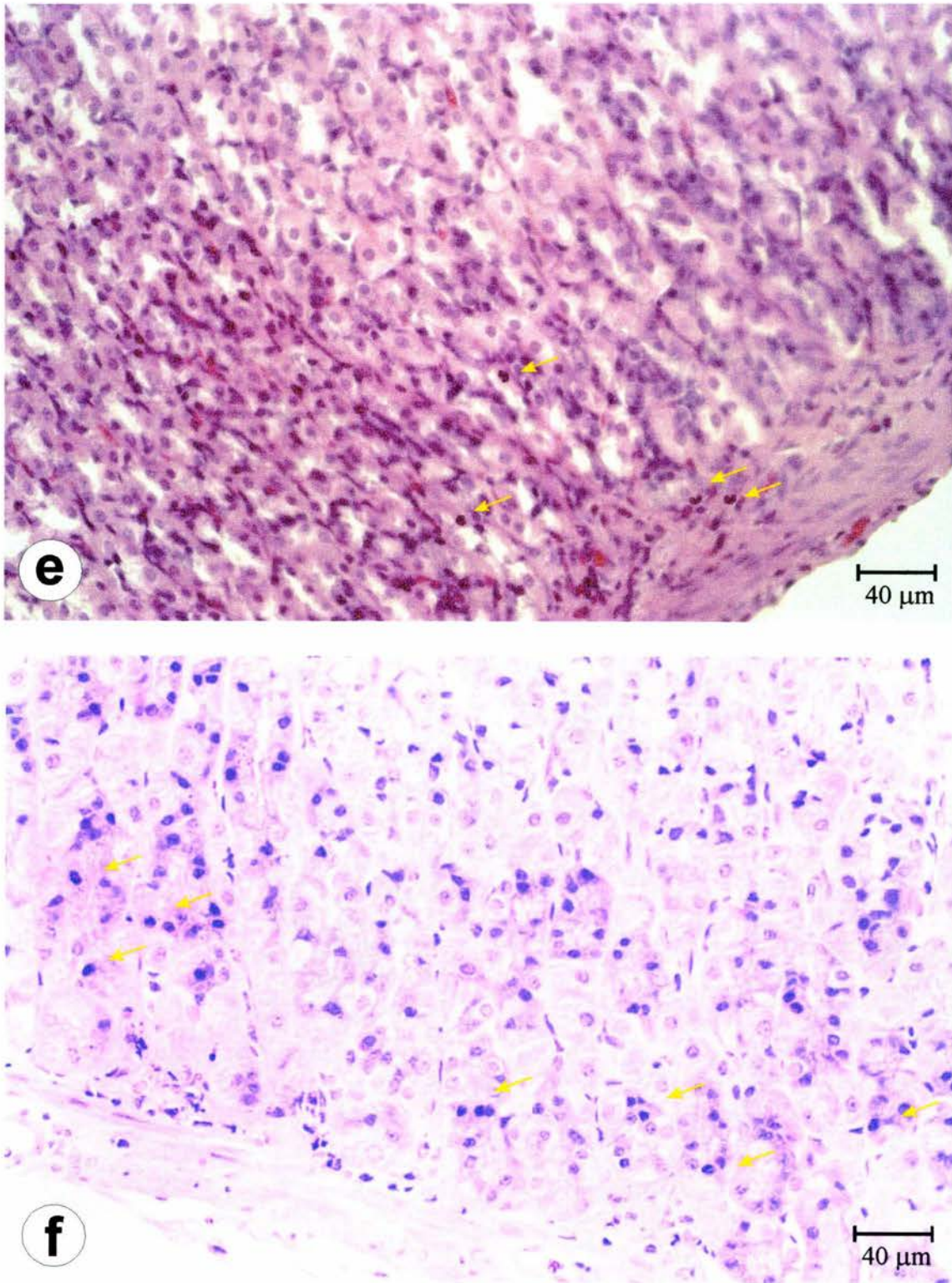


Figura 4 e-f. Micrografías de la mucosa gástrica de ratas con gastritis. Las que recibieron mucílago presentaron un menor número de polimorfonucleares desde las 48 hrs (e) respecto de las ratas sin tratamiento con mucílago, aún a las 72 hrs (f). Se tiñó con hematoxilina-eosina y se utilizó el objetivo 40x. Las flechas señalan las células polimorfonucleares.

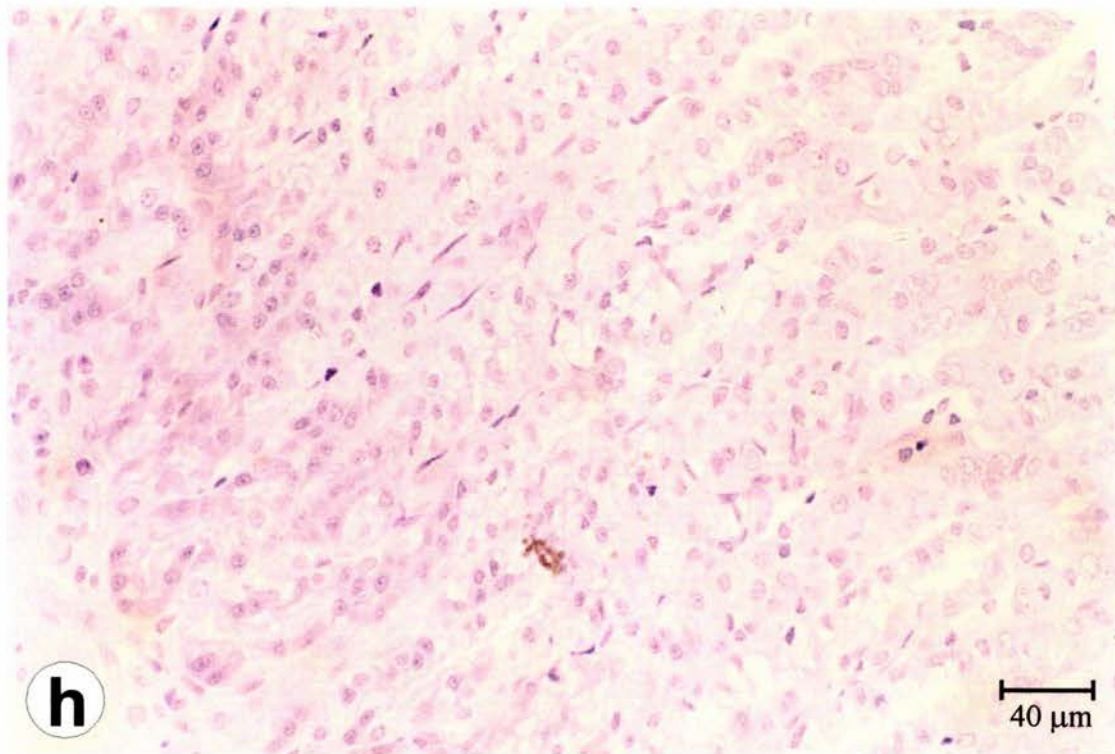
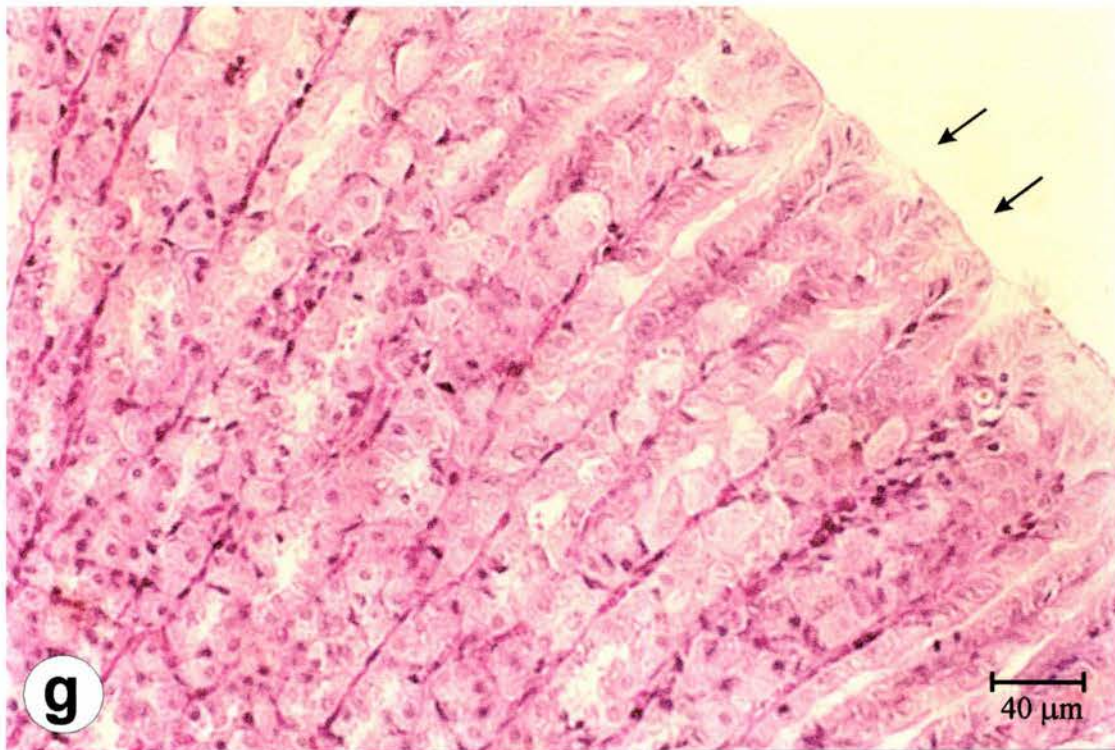


Figura 4 g-h. Micrografías de la mucosa gástrica de ratas con gastritis. La presencia de polimorfonucleares a las 72 hrs es muy baja o no se presentan (g-h) y los bordes epiteliales presentan poca alteración, como se señala con flechas (g). Se tiñó con hematoxilina-eosina y se utilizó el objetivo 40x.

dichas lesiones histológicas encontradas en ratas que presentaron gastritis en forma estadísticamente significativa (tabla 1) respecto de las que no lo recibieron.

Tabla 1. Perfil histológico. Incidencia de lesiones microscópicas en estómagos de ratas que recibieron etanol y mucílago.

Tratamientos	Tiempo	PMN infiltrados**		Epitelio Superficial (alteración)		Células Especializadas (alteración)		
		Horas	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$	Gpos. Tukey*	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$	Gpos. Tukey*	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$	Gpos. Tukey*
Sin gastritis	24-72		0.0001 ± 3.27	E	0.001 ± 0.0001	C	0.0001 ± 0.0001	E
Gastritis	24		0.058 ± 0.012	A	4.3 ± 1.0	AB	4.5 ± 0.55	A
Gastritis + Mucílago	24		0.093 ± 0.014	B	5.2 ± 1.17	A	4.2 ± 1.33	A
Gastritis	48		0.073 ± 0.014	AB	4.5 ± 0.84	AB	3.2 ± 0.41	AB
Gastritis + Mucílago	48		0.086 ± 0.005	CD	2.8 ± 0.75	B	1.7 ± 0.82	CD
Gastritis	72		0.056 ± 0.006	C	3.2 ± 1.33	B	2.3 ± 1.03	BC
Gastritis + Mucílago	72		0.039 ± 0.005	DE	0.8 ± 0.75	C	0.3 ± 0.52	DE

* *Misma letra indica diferencia no estadística usando una $\alpha = 0.05$ y una ANOVA, $P < 0.0001$*

** *PMN= Leucocitos polimorfonucleares infiltrados.*

5.2 Ensayos Bioquímicos

En ninguna de las condiciones a las que se sometieron las ratas modificó en forma significativa el contenido total de fosfolípidos de membrana. Sin embargo, el etanol originó modificaciones en la proporción de especies de fosfolípidos; aumentando fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, y disminuyendo fosfatidilinositol y fosfatidilcolina, respecto del grupo

sin gastritis, los cuales no presentaron cambios en la composición de fosfolípidos (tabla 2). Por su parte, los niveles de colesterol en la membrana plasmática mostraron cambios importantes en respuesta a los daños en la mucosa. En el grupo con gastritis, se observó un incremento temprano del colesterol, el cual fue significativo al tiempo final estudiado. La administración de mucílago fue exitosa en restaurar el contenido normal de colesterol membranar (tabla 3) y la composición de fosfolípidos, medidos como la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina, desde las 72 hrs (tabla 2).

Tabla 2. Composición de fosfolípidos (nmol/mg de proteína) de membranas de células epiteliales de mucosas estomacales de ratas. Datos expresados como la media \pm desviación estandar.

E.F.*	Sin gastritis	Gastritis (24 hrs)	Gastritis + mucílago (24 hrs)	Gastritis (48 hrs)	Gastritis + mucílago (48 hrs)	Gastritis (72 hrs)	Gastritis + mucílago (72 hrs)
FS*	140 \pm 17	164 \pm 16	185 \pm 15	184 \pm 22	174 \pm 12	192 \pm 26	139 \pm 30
FI*	337 \pm 13	273 \pm 20	289 \pm 41	246 \pm 22	268 \pm 24	247 \pm 29	313 \pm 19
FC*	341 \pm 17	231 \pm 27	236 \pm 26	244 \pm 15	282 \pm 29	281 \pm 22	333 \pm 13
FE*	151 \pm 14	235 \pm 24	254 \pm 24	195 \pm 17	170 \pm 11	181 \pm 13	144 \pm 19
Totales	969 \pm 61	903 \pm 87	964 \pm 106	869 \pm 76	894 \pm 76	900 \pm 89	929 \pm 80
Grupos Tukey Totales**	A	A	A	A	A	A	A
FC/FE	2.26 \pm 0.23	0.99 \pm 0.34	0.93 \pm 0.14	1.25 \pm 0.07	1.65 \pm 0.21	1.55 \pm 0.16	2.31 \pm 0.25
Grupos Tukey FC/FE**	A	D	D	CD	B	BC	A

* FS= fosfatidilserina, FI= fosfatidilinositol, FC= fosfatidilcolina, FE= Fosfatidiletanolamina.

** Misma letra indica diferencia no estadística usando una $\alpha = 0.05$ y una ANOVA, $P < 0.0001$

Tabla 3. Contenido de colesterol membranar total de mucosas gástricas de ratas con y sin gastritis y tratadas con mucílago.

Tratamiento	Tiempo (horas)	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$ (nmol/mg proteína)	Grupos Tukey*
Sin gastritis	24 -72	122 \pm 6.1	C
Gastritis	24	257 \pm 17.5	A
Gastritis + mucílago	24	249 \pm 20.6	A
Gastritis	48	269 \pm 29.1	A
Gastritis + mucílago	48	197 \pm 15.2	B
Gastritis	72	240 \pm 27.0	A
Gastritis + mucílago	72	130 \pm 13.9	C

* Resultados de la prueba Tukey para las medias: misma letra indica diferencia no estadística usando una $\alpha = 0.05$ y una ANOVA, $P < 0.0001$

Como una consecuencia de los efectos descritos anteriormente, un parámetro importante, que permite determinar la fluidez de la membrana y en este sentido el buen funcionamiento celular, es la proporción de colesterol con respecto a los fosfolípidos. Esta relación se modificó por efecto de la gastritis. Los animales control, sin gastritis presentaron un proporción muy constante y los tratados con mucílago solo alcanzaron ésta condición normal en forma significativa hasta las 72 hrs (figura 5).

Por su parte, las membranas plasmáticas de ratas con gastritis presentaron un incremento drástico de la relación colesterol/fosfolípidos (cercano al 100%), de 24 a 72 hrs después de la administración de etanol (figura 5). El mucílago administrado a las ratas con daño en la mucosa, provocó una reversión gradual en la relación colesterol/fosfolípidos, la cual llegó a ser similar a la presentada por los sujetos control y mucho menor a la encontrada en las membranas plasmáticas de las ratas con gastritis en todos los tiempos (figura 5).

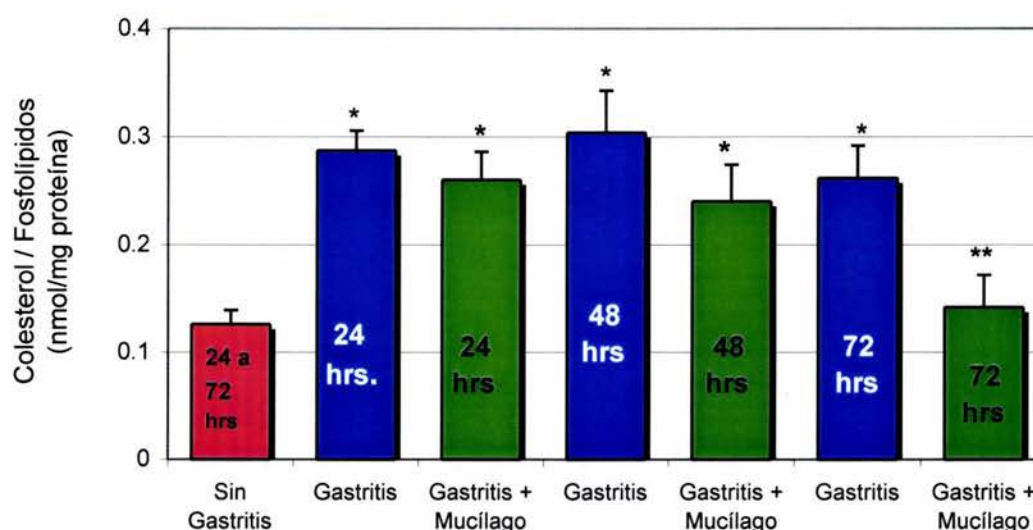


Figura 5. Relación colesterol / fosfolípidos de membrana de mucosas gástricas de ratas con y sin gastritis y tratadas con mucílago. Usando una $\alpha = 0.05$ y una ANOVA $P < 0.0001$ se compara: * vs ratas sin gastritis y ** vs ratas con gastritis sin recibir mucílago correspondientes al mismo tiempo.

Las tablas 4 y 5 muestran respectivamente los efectos en las actividades enzimáticas citosólicas de ADH y LDH inducidas por los tratamientos. En animales control que recibieron mucílago, la actividad de la ADH disminuyó a las 24 hrs (13.5%, al compararla con los sujetos control). La actividad de la ADH rápidamente se incrementó después de 24 hrs y se mantuvo constante desde las 48 hrs después de cesar la administración de etanol (tabla 4). Sin embargo, la administración de mucílago originó una elevación en la actividad de esta enzima en forma acelerada, induciendo un aumento significativo de su actividad, observándose diferencias significativas respecto de las ratas que no recibieron mucílago y alcanzado la condición normal, todo esto a las 48 y 72 hrs, como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Actividad específica de alcohol deshidrogenasa de mucosas gástricas de ratas con y sin gastritis y tratadas con mucílago. Se comparan las medias utilizando la prueba de Tukey.

Tratamientos	Tiempo (horas)	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$ (nmol/min/mg proteína)	Grupos Tukey*
Sin gastritis	24-72	28.0 \pm 2.92	A
Gastritis	24	12.6 \pm 1.14	C
Gastritis + mucílago	24	19.0 \pm 0.80	B
Gastritis	48	18.4 \pm 1.78	B
Gastritis + mucílago	48	30.7 \pm 2.2	A
Gastritis	72	19.7 \pm 2.00	B
Gastritis + mucílago	72	29.8 \pm 1.63	A

* Misma letra indica diferencia no estadística usando una $\alpha = 0.05$ y una ANOVA, $P < 0.001$

Respecto de la actividad específica de LDH no se presentaron diferencias entre las ratas con y sin tratamiento de mucílago, sin embargo todas ellas presentaron actividades elevadas respecto de los controles (tabla 5).

Tabla 5. Actividad específica de lactato deshidrogenasa de mucosas gástricas de ratas con y sin gastritis y tratadas con mucílago.

Tratamientos	Tiempo (horas)	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	Grupos Tukey*
Sin gastritis	24 - 72	2.11 ± 0.144	C
Gastritis	24	3.21 ± 0.187	A
Gastritis + mucílago	24	2.98 ± 0.364	AB
Gastritis	48	3.10 ± 0.177	AB
Gastritis + mucílago	48	2.95 ± 0.115	AB
Gastritis	72	2.87 ± 0.121	AB
Gastritis + mucílago	72	2.71 ± 0.257	B

* *Misma letra indica diferencia no estadística usando una $\alpha = 0.05$ y una ANOVA, $P < 0.0001$ con una prueba de Tukey.*

5.3 Modelo Molecular

La estructura del mucílago se desarrolló simulando las condiciones más cercanas a las que se encuentra en la célula; ésto es, altamente hidratado y con iones de Ca^{2+} asociados (figura 6). Sin embargo, para evaluar el efecto de interacciones intramoleculares se analizó la molécula bajo diferentes condiciones, esto es en fase gaseosa, acuosa, modificando las cargas de los carboxilatos y la presencia de Ca^{2+} .

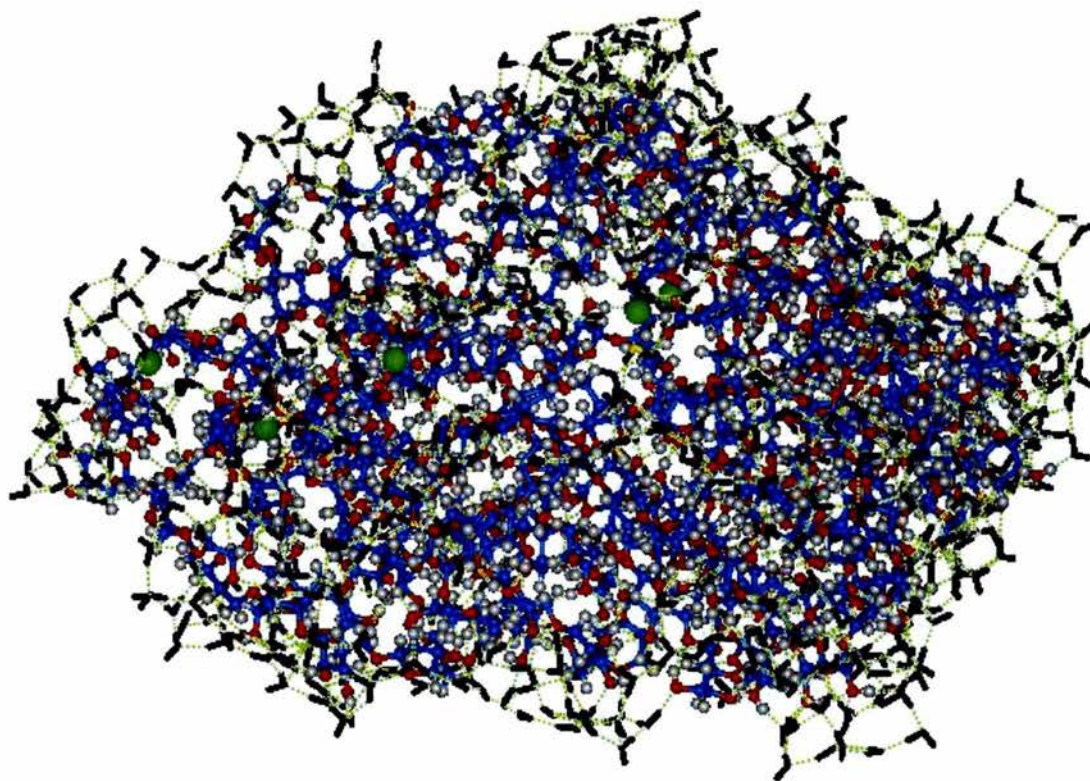


Figura 6. Estructura molecular del mucílago formando complejos con Ca^{2+} y asociado con moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno. Los átomos de carbono en azul, oxígeno en rojo, hidrógeno en gris, calcio en verde y en color negro las moléculas de agua. Las líneas punteadas en verde, indican puentes de hidrógeno.

5.3.1 Efecto de los carboxilatos en fase gaseosa.

En fase gaseosa, como resultado de la modificación en las cargas iónicas sobre la cadena principal, es decir convertir los ácidos carboxílicos (neutros) a carboxilatos (aniones), se observó un aumento en la energía directamente proporcional al número de carboxilatos. La posición del carboxilato no afectó a la energía como lo indica la figura 7a, dónde se observó que el incluir un solo carboxilato (-1) y cambiarlo de posición a lo largo de la cadena principal produjo energías similares.

En fase de hidratación, la energía disminuyó al aumentar el número de carboxilatos y al igual que en la fase gaseosa la posición del carboxilato no afectó la energía como lo muestra la figura 7b.

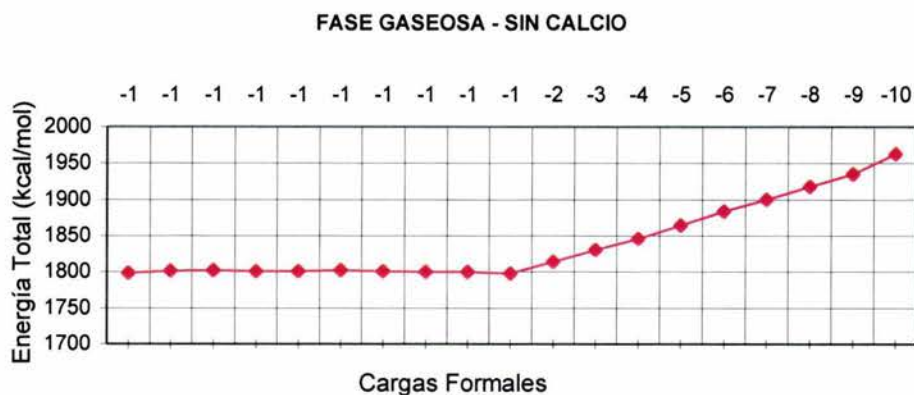


Figura 7a. Variación en las cargas formales a lo largo de la estructura molecular del mucílago en fase gaseosa y sin incluir calcio.

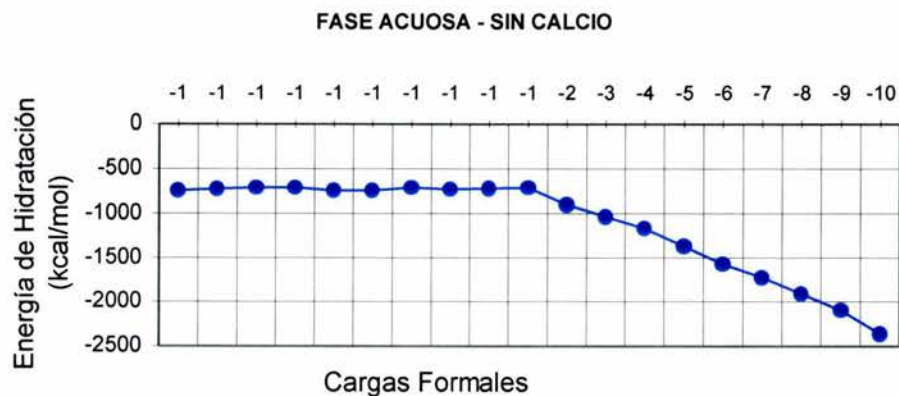


Figura 7b. Variación en las cargas formales a lo largo de la estructura molecular del mucílago en fase acuosa y sin incluir calcio.

5.3.2 Efecto del Ca^{2+}

En fase gaseosa, la presencia de Ca^{2+} es favorable energéticamente y propicia una tendencia a la estabilidad molecular al formarse los complejos iónicos entre el Ca^{2+} y los carboxilatos como lo muestra la figura 8a, donde la energía disminuye al aumentar el número de iones de Ca^{2+} , no afectando la posición en la que se formó el complejo iónico. Esto puede ser indicativo de ausencia de selectividad de Ca^{2+} por alguno de los galacturonatos.

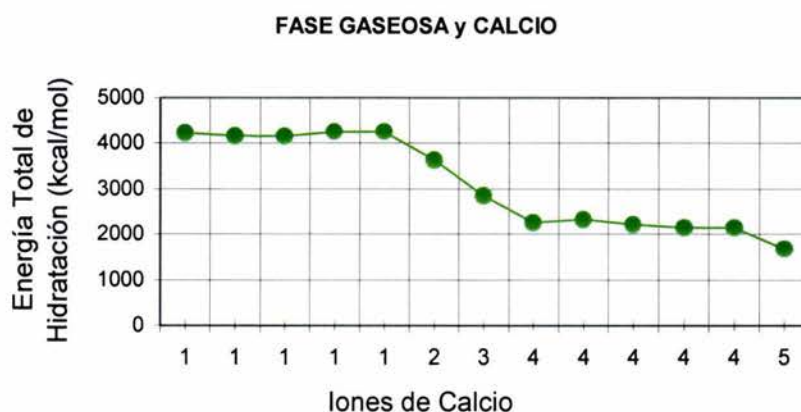


Figura 8a. Variación en el número de iones de calcio asociados al mucílago en fase gaseosa y con carga formal de -10 .

En fase de hidratación, se manifestó un efecto similar al ocurrido en fase gaseosa, es decir hubo una disminución en la energía al aumentar los iones de Ca^{2+} , sin embargo la diferencia en energía entre 1 y 5 iones de Ca^{2+} fue muy pequeña como lo muestra la figura 8b. Esto puede deberse al efecto de la solvatación, en donde el agua actúa como una pantalla que impide la interacción directa entre los galacturonatos y Ca^{2+} .

La energía total del mucílago bajo estas condiciones fue de $-4,899$ kcal/mol. Las características moleculares resultantes correspondieron a una molécula ovoide con dimensiones; 58.24 de largo por 34.85 Å de ancho, formada por 92 monosacáridos, siendo estos galacturonato y ramnosa en la cadena principal y galactosa, arabinosa y xilosa en las 10 cadenas laterales. El mucílago alcanzó el equilibrio a través de 244 puentes de hidrógeno intramoleculares y 1,044 intermoleculares con agua, además de interacciones electrostáticas, estéricas y iónicas.

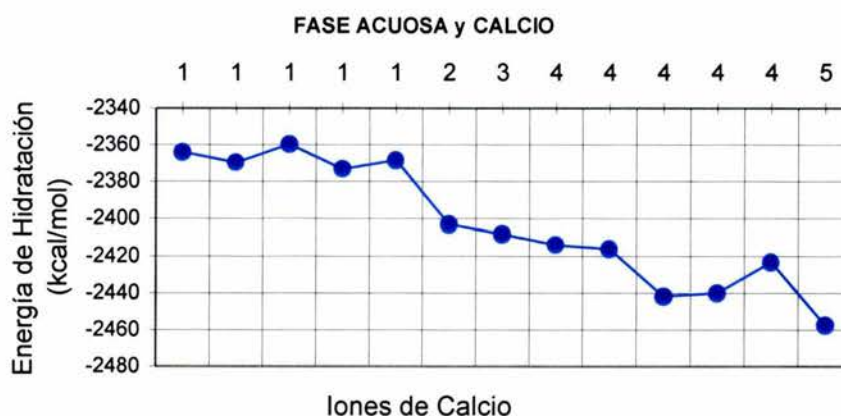


Figura 8b. Variación en el número de iones de calcio en asociación al mucílago en fase acuosa. Mucílago con carga formal de -10 .

El efecto más importante sobre los carboxilatos y sobre la estructura en general se debió a la interacción con el Ca^{2+} . Estos iones formaron una esfera de ionización, entre uno o dos carboxilatos, atrayendo a un punto medio al Ca^{2+} y acercándose entre sí dos galacturonatos. Esto originó, que la cadena principal adquiriera una forma moderadamente cilíndrica que corresponde a un arreglo de tipo giros al azar, como lo muestran los ángulos ϕ y ψ (tabla 6).

Tabla 6. Ángulos ϕ y ψ de la cadena principal del mucílago*.

Disacáridos		Ángulos ϕ	Ángulos ψ
1° Galacturonato	2° Ramnosa	38	71
2° Ramnosa	3° Galacturonato	87	174
3° Galacturonato	4° Ramnosa	26	145
4° Ramnosa	5° Galacturonato	-122	119
5° Galacturonato	6° Ramnosa	68	99
6° Ramnosa	7° Galacturonato	93	113
7° Galacturonato	8° Ramnosa	-172	-140
8° Ramnosa	9° Galacturonato	-82	-51
9° Galacturonato	10° Ramnosa	-40	97
10° Ramnosa	11° Galacturonato	63	-90
11° Galacturonato	12° Ramnosa	102	101
12° Ramnosa	13° Galacturonato	64	143
13° Galacturonato	14° Ramnosa	95	40
15° Ramnosa	16° Galacturonato	-113	125
16° Galacturonato	17° Ramnosa	32	74
17° Ramnosa	18° Galacturonato	97	117
18° Galacturonato	19° Ramnosa	107	76
19° Ramnosa	20° Galacturonato	67	108
20° Galacturonato	21° Ramnosa	-87	112

* Ángulos ϕ (O5-C1-O4'-C4') y ψ (C1-O4'-C4'-C5') de acuerdo a la figura 3.

Aún cuando la presencia de agua compitió y afectó la formación de complejos iónicos, los iones de Ca^{2+} formaron en todos los casos asociaciones con los carboxilatos. Sin embargo, no todos los carboxilatos formaron asociaciones con alguno de los 5 iones de Ca^{2+} . La interacción entre el Ca^{2+} y los carboxilatos ocurrió al haber un acercamiento gradual de una distancia inicial de 5 Å a una distancia final de entre 2.19 y 2.39 Å ($x=2.33 \pm 0.86$) de los oxígenos del carboxilato al átomo de Ca^{2+} . Con la optimización de la geometría de la monocapa de fosfolípidos se obtuvo una capa con una representación heterogénea en la composición de fosfolípidos, rectangular de 87.53 Å de largo y 51.6 Å. Es decir una superficie de 4,516 Å² capaz de albergar el modelo molecular del mucílago durante la interacción entre ambas moléculas en la dinámica molecular (figura 9a).

Como resultado de la interacción entre el mucílago y la membrana se observó una atracción entre ambas macromoléculas. Por efecto de la atracción, ocurrió una reducción en la distancia entre ambas a lo largo de la dinámica molecular. La distancia original de 25 Å (figura 9b), se acortó paulatinamente hasta ejercerse un contacto entre el mucílago y la capa de fosfolípidos (figura 9c). Los tipos de interacciones observadas entre el mucílago y la capa de fosfolípidos fueron iónicas, formadas entre los carboxilatos de los residuos de galacturonato y las aminas cuaternarias de las cabezas de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina. Sin embargo, también se presentaron puentes de hidrógeno entre los hidroxilos de ambas macromoléculas y al ocurrir una reducción en la energía por efecto de la interacción, es evidente que los contactos estéricos, electrostáticos además de los puentes de hidrógeno y puentes iónicos, tuvieron una resultante favorable para ambas moléculas debido a que la energía del complejo fue menor al ocurrir la asociación del mucílago con la membrana respecto del paso inicial a 25 Å de distancia, donde ninguno de estas interacciones intermoleculares se presentaron.

Esto demostró la capacidad del mucílago para asociarse a la superficie de la membrana de fosfolípidos.

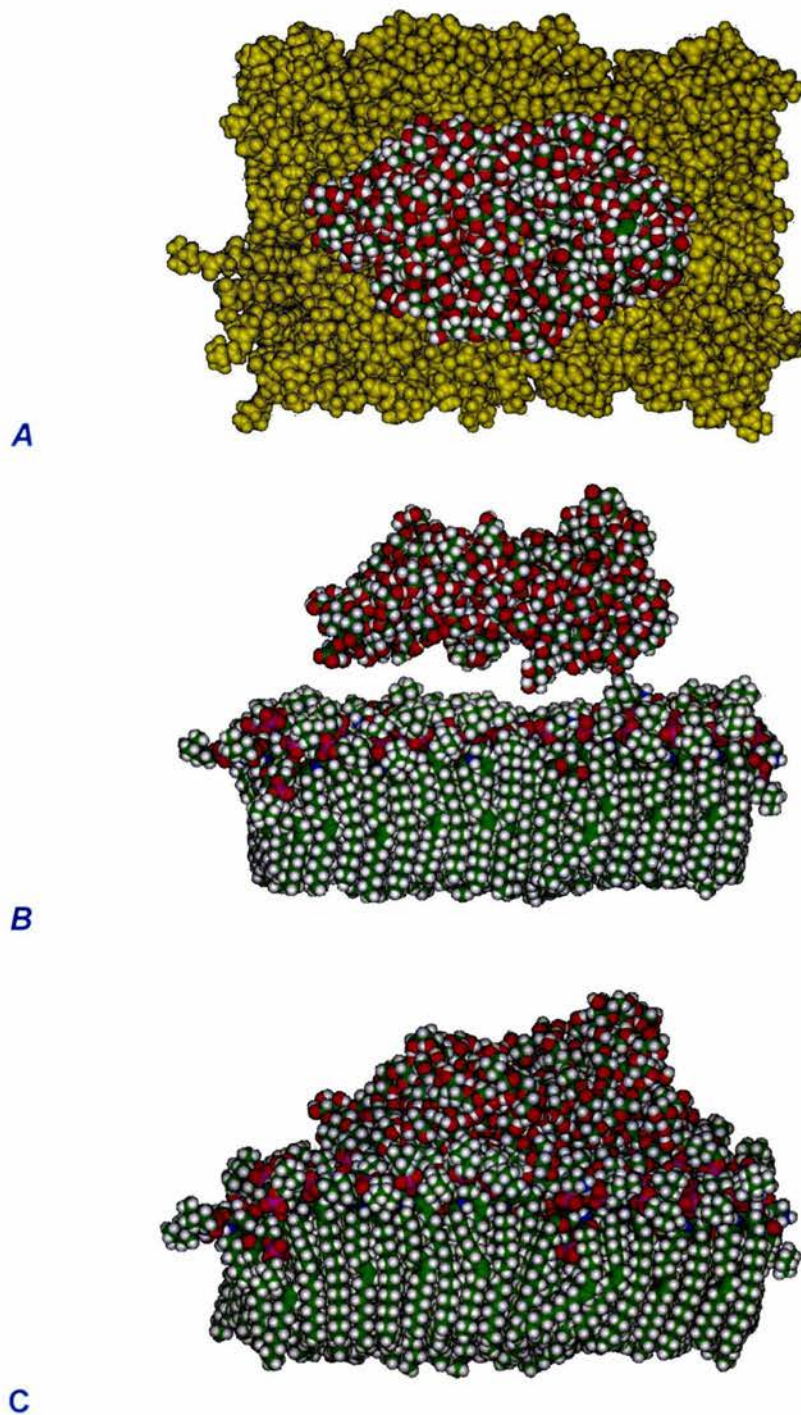


Figura 9. Interacción entre el mucílago y una monocapa de fosfolípidos. (A) Vista superior, monocapa de fosfolípidos en amarillo y (B) vista lateral, interacción a 10 Å de distancia y (C) formación del complejo estable al finalizar la mecánica molecular.

6. DISCUSION

En el presente estudio se analizaron las propiedades terapéuticas del mucílago de *Opuntia ficus-indica*, evaluando su capacidad para revertir las alteraciones del epitelio estomacal de ratas a las que se les administró etanol para inducir una gastritis subcrónica. El modelo además fue diseñado para lograr un esquema que fuera similar a una gastritis activa, tal como la que se manifiesta en personas que ingieren alcohol. Para esto, se evitó el uso de altas concentraciones de etanol, el cual puede ser ulcerogénico aún con frecuencia de administración baja o concentraciones bajas que podrían dificultar el diferenciar entre la reversión al estado normal por efecto del mucílago o por los procesos autónomos de reparación del organismo. El equiparar este modelo a la gastritis alcohólica humana es una buena aproximación a pesar de la diversidad de hábitos de ingesta de alcohol que prevalece, en este sentido, se puede señalar que el daño gástrico inducido en las ratas fue muy similar histológicamente al encontrado en personas con gastritis activa, lo que permite tener la certeza que la extrapolación es válida para un buen número de condiciones. Así mismo, aún cuando la gastritis puede tener diversos orígenes o agentes etiológicos, el resultado es el mismo. Se produce inflamación y erosión de la mucosa gástrica, de manera que una vez producida la gastritis, la acción terapéutica puede tratarse de forma moderadamente similar, es decir retirar el agente nocivo y aplicar un agente terapéutico [35].

6.1 Histología

La administración de una disolución concentrada de etanol ha demostrado ser un buen inductor de daño en la mucosa gástrica, originando una perturbación de más del 80% de la superficie de las células epiteliales a través de las glándulas estomacales en

ratas [74,75]. Los hallazgos histológicos demostraron que los sujetos a los que se les administró etanol presentaron alteraciones de la mucosa gástrica desde las 24 hrs, no así los sujetos control, esto permitió comparar los perfiles histológicos y bioquímicos de sujetos con gastritis con respecto de sujetos sanos a lo largo del tiempo, así como el proceso de recuperación de manera espontánea, sin aplicación de algún agente terapéutico y aplicando mucílago. La presencia de gastritis se determinó al observar al microscopio alteraciones consistentes en perturbación de la superficie epitelial, pérdida de células especializadas, edema en grado variable de la submucosa, caracterizado por la presencia de leucocitos polimorfonucleares.

Las sales biliares, aspirina, y ácidos pueden difundirse al interior de las células epiteliales e inicialmente causar daño celular interno sin alterar la membrana celular apical y sin producirse exfoliación celular del epitelio [35]. El tratamiento con etanol induce daño directo de las células de la mucosa gástrica, probablemente por el desarrollo de radicales libres e hiperoxidación de lípidos, produciendo de esta forma exfoliación [76]. Las evidencias histológicas encontradas indican un efecto sobre los complejos proteínicos de unión intercelular y/o directamente originando muerte celular, al observarse perturbación y exfoliación de la superficie epitelial. El daño de la superficie epitelial puede tener efectos muy importantes sobre la integridad de la mucosa gástrica, si se considera que actúa como una barrera, que es responsable de mantener el gradiente de pH intraluminal, secretar bicarbonato (HCO_3^-) y mucus, contribuyendo a su papel protector y coordinando los procesos de regulación del estómago [35]. Por lo tanto, el daño originado sobre este estrato celular es muy importante para explicar los mecanismos de alteración y restauración de la mucosa gástrica. Las células de la superficie epitelial, normalmente son completamente renovadas de cinco a ocho días y la exfoliación de estas células es un

proceso fisiológico normal. En condiciones de ulceración por estrés o por efecto del etanol, las células epiteliales pueden ser destruidas completamente en la porción fúndica de la mucosa en algunos minutos [35] y esto fue evidente en los sujetos que recibieron etanol, los cuales manifestaron perturbación del epitelio superficial desde las 24 hrs de evaluación. Los sujetos a los que no se les aplicó mucílago, no lograron establecer la condición normal aún a las 72 hrs. Por el contrario, los que recibieron mucílago manifestaron una menor perturbación en el epitelio superficial, alcanzándose la condición normal a las 72 hrs, indicando de forma evidente que la velocidad de restauración fue mayor al aplicar el mucílago. Las células del cuello, localizadas en las regiones del cuello y el Istmo de las glándulas gástricas, son células progenitoras y son capaces de migrar para reemplazar las células epiteliales superficiales exfoliadas. En la gastritis subcrónica ocurre una alteración y pérdida de células especializadas (tabla 1). Cuando el daño es recurrente y no se permite que ocurra la recuperación, se altera además del arreglo celular, los vasos capilares que nutren al tejido, originando a la larga un proceso ulcerogénico o gastritis crónica; sin embargo, en los sujetos estudiados se mantuvo en forma general la citoarquitectura de la mucosa gástrica, a pesar de la exfoliación en la superficie celular del epitelio cercana al ápice glandular, que en forma general permaneció sin alteración. Esta región profunda es donde se lleva a cabo la proliferación celular y son las células responsables de reemplazar el epitelio gástrico en condiciones normales o ante un estímulo adverso [35]. Al aplicar el mucílago no ocurre una interacción directa sobre estas células, sin embargo al ser un polisacárido de alto peso molecular puede actuar sinérgicamente junto con los demás factores de defensa (bicarbonato y mucinas) de la mucosa gástrica e impedir que estímulos adversos como puede ser el HCl o pepsinas actúen sobre el epitelio. El proceso de reparación puede verse favorecido, lo que

explicaría la mejoría manifestada por una menor perturbación en la superficie epitelial y en las células especializadas (tabla 1), especialmente a las 72 hrs de aplicación. Uno de los elementos más importantes para determinar la presencia y tipo de gastritis es el encontrar infiltrado inflamatorio caracterizado específicamente por la presencia de neutrófilos, cuya actividad deriva de la aparición de especies reactivas de oxígeno y proteasas, de tal forma que su actividad es una indicación evidente de un tejido dañado y la densidad de neutrófilos intraepiteliales se correlaciona directamente con la extensión del daño en la mucosa gástrica [77]. Los neutrófilos se encontraron en la lamina propia, en el epitelio (particularmente en la región del cuello glandular) y dentro del lumen de la fóvea, desde las 24 hrs, disminuyeron en forma gradual y más rápida en los sujetos que recibieron mucílago, como se muestra en la tabla 1, pudiendo considerarse que el mucílago disminuye el proceso inflamatorio a una velocidad de un 41% respecto de los sujetos que no recibieron este tratamiento (desde las 48 hrs). Si se considera que la citoarquitectura producto de una gastritis subcrónica se conservó como lo indican los datos histológicos, entonces la microcirculación que propicia inicialmente la incorporación de neutrófilos y que se ve favorecida por la estásis vascular en el tejido. Al aplicar el mucílago se forma una capa extensa que recubre y evita la difusión e inducción de especies reactivas de oxígeno y proteasas al interior del epitelio [76], evitando de esta forma la aparición de mayor número de neutrófilos, y además se favoreció su liberación a través de la microvasculatura de tal forma que el efecto es directo sobre el número de neutrófilos.

6.2 Parámetros Bioquímicos

Como consecuencias de la administración de etanol se originan alteraciones como las señaladas, además una reducción en la diferencia de potencial y secreción de H^+ , así

como un aumento de la concentración de Na^+ en el lumen a un pH neutro; estos eventos son indicativos de la ocurrencia de cambios muy profundos en la permeabilidad de la membrana [78-80]. También se ha encontrado una actividad deficiente de la bomba de sodio de la membrana plasmática de las células epiteliales del estómago [81], lo que apoya la idea de que ocurre un proceso general de alteración sobre la membrana plasmática de la mucosa gástrica en animales con lesiones causadas por etanol. La acción multifactorial del etanol en la generación de daños en la mucosa gástrica puede ser relacionado con la liberación de mediadores derivados del tejido por los mastocitos de la mucosa en respuesta al trauma no específico [82], ligado a cambios microcirculatorios, estásis inducida por estrés son eventos encontrados en áreas lesionadas [83]. Basado en lo anterior, se esperaba la presencia de alteraciones de la membrana plasmática de la mucosa gástrica en ratas con gastritis inducida con etanol, tal como ocurrió.

El presente estudio muestra que membranas plasmáticas aisladas de mucosa gástrica de ratas con gastritis se caracterizan por presentar alteración en sus características estructurales al presentar un incremento drástico en la relación colesterol/fosfolípidos (figura 5), un aumento de los fosfolípidos; fosfatidilinositol y fosfatidilcolina acompañado de una disminución en fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (tabla 2), lo que sugiere claramente que la fluidez de la membrana disminuye por la gastritis inducida por etanol. Lo publicado sobre la composición de fosfolípidos de la mucosa gástrica durante el proceso de gastritis señala; una mayor presencia de fosfatidilcolina (FC), una relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina (FC/FE) disminuida, esto último correlacionado con un aumento en la metilación de lípidos. También se señala un incremento en el contenido de colesterol esterificado en la mucosa [34] como lo muestra el presente estudio (tabla 3). La relación que guarda el colesterol respecto del

contenido total de fosfolípidos influye en la fluidez de la membrana, debido a que el colesterol se orienta en la bicapa lipídica con sus grupos hidroxilos próximos a las cabezas polares de las moléculas de fosfolípidos; sus anillos esteroideos, planos y rígidos, interactúan con las regiones de las cadenas hidrocarbonadas que son más cercanas a los grupos polares de la cabeza, en parte inmovilizandolas pero dejando el resto de la cadena más flexible. Así mismo, bajo condiciones de alteración membranal, el colesterol aumenta [72,84,85]. Al determinar el contenido total de colesterol y fosfolípidos, y establecer el producto de la relación colesterol/fosfolípidos, se encontró un índice elevado respecto de la condición normal (tabla 2), esta condición se ha demostrado que origina una alteración en la permeabilidad membranal debido a que al disminuir la movilidad de los primero grupos CH₂ de las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de fosfolípidos, el colesterol hace a la bicapa lipídica más rígida en esta región y de ese modo disminuye la permeabilidad de la bicapa a moléculas solubles pequeñas [86,87]. El mecanismo involucrado en las alteraciones inducidas con etanol en la composición de fosfolípidos de las membranas mucosas es desconocido; sin embargo, la presencia de fosfolipasas activas dependientes de calcio (principalmente fosfolipasas A₁ y A₂) en mucosa gástrica, pueden inducir un daño marcado en la mucosa gastrointestinal [88], debido a que están involucradas en la liberación de ácido araquidónico, de fosfolípidos de membrana y del factor activador plaquetario [89]. Además, al producir, lisofosfatidilcolina, se inducen erosiones en la mucosa, inflamación y congestión vascular, haciendo que el infiltrado de leucocitos PMN sea dosis dependiente a liso-FC [90].

La administración del mucílago a animales con gastritis indujo una disminución confiable de las anormalidades histológicas de la mucosa gástrica, siendo capaz de corregir la degeneración del epitelio superficial y la pérdida de células especializadas y

reducir la inflamación en la lamina propia (tabla 1). Todos estos cambios histológicos son reconocidos por ocurrir durante el proceso de la gastritis [91]. El mucílago indujo reversión de los daños en la mucosa gástrica, efecto manifestado en la relación colesterol/fosfolípidos la cual se normalizaron en forma significativa a las 72 hrs (figura 5). La administración de fosfolípidos de superficie activa ejercen alguna protección contra el daño de la mucosa gástrica, inducido por agentes nocivos solubles en agua [92]. En ese sentido, los efectos citoprotectores de las prostaglandinas pueden ser debidos parcialmente a un incremento localizado en la concentración de fosfolípidos, los cuales pueden aumentar la hidrofobicidad de la cubierta de la mucosa gástrica [93]. Si la acción del mucílago en la composición de los fosfolípidos, encontrada en animales con gastritis, puede ser mediada por cambios en la concentración de prostaglandinas de la mucosa gástrica, este mecanismo de protección debería ser estudiado.

Como se ha señalado, los cambios en el contenido de fosfolípidos y colesterol de la membrana plasmática afectan la fluidez de la membrana [72,87,94]. El mucílago efectivamente corrigió la relación colesterol/fosfolípidos en ratas que presentaron gastritis en forma significativa (figura 5). Esto implica no solo una restauración estructural de la membrana (composición de fosfolípidos), también implica la normalización en la función relacionada con el intercambio de moléculas a través de la membrana.

Las actividades específicas de enzimas citosólicas se ha aplicado como un indicador de la condición de la mucosa gástrica [34]. Las ratas tratadas con etanol mostraron una disminución importante de la actividad de la enzima ADH inicialmente (24 hrs), pero después de suspender la administración de etanol la actividad de ADH fue constante. Por su parte, la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), también fue modificada por el tratamiento evaluado; la gastritis, más que el mucílago indujo

cambios en la actividad específica de esta enzima (tabla 5) indicando que el efecto terapéutico ejercido por el mucílago no está relacionado con el metabolismo de esta enzima como ocurre con los antagonistas de los receptores H₂ de histamina [34]. La gastritis crónica activa inducida por *H. pylori* origina una disminución gástrica de la actividad de la ADH en el antro, asociada con inflamación y disminución de las mucinas epiteliales [95] y una ausencia de la isoenzima ADH gástrica que se ha relacionado con cáncer en estómago en humanos [96]. Sin embargo, la ausencia de nódulos formados por colonias *H. pylori* durante el análisis histológico, supone que los efectos sobre estas enzimas sólo son debido al etanol y al mucílago. Así mismo, la metaplasia intestinal y gastritis son acompañadas por una elevación significativa de los valores relativos de LDH en la mucosa antral, lo que puede ser indicativo de malignidad previa a los cambios morfológicos [58].

Los resultados indican evidentemente una disminución en la actividad de la ADH de la mucosa gástrica por efecto del etanol administrado a las ratas (tabla 4) y que a diferencia de los antagonistas del receptor H₂ de histamina los cuales se sabe que retardan la eliminación del etanol [97] debido, según se señala, a la inhibición de la actividad de la ADH gástrica [95], en el caso de la aplicación del mucílago este efecto colateral de los antagonistas del receptor H₂ de histamina no se observó, por el contrario, la actividad de la ADH se incrementó rápidamente (tabla 4). Los resultados sugieren que las actividades de las enzimas citosólicas pueden estar reflejando eventos de restauración o proliferación ocurridos en las células de la mucosa, mismas que son afectadas por la administración del mucílago, particularmente en la ADH.

Algunas posibilidades pueden ser consideradas revisando el posible mecanismo de acción de reversión del mucílago, y en especial el daño de la mucosa gástrica inducida por etanol. A diferencia de los antagonistas del receptor H_2 de histamina que inhiben la secreción de ácido y el cual es un importante componente que contribuye al daño y según el cual estos fármacos protegen la mucosa gástrica [97], el mucílago puede ejercer un efecto no inhibitorio directo. Este puede más bien actuar como amortiguador de la secreción de ácido al formar una cubierta sobre el epitelio, al establecer una asociación con la capa de mucus, por interacción directa entre los monosacáridos de las mucinas y los fosfolípidos. De esta forma, se puede establecer una barrera física que evite la retrodifusión de H^+ al epitelio, evitando un deterioro adicional, propiciando de esta forma una regulación gradual de la secreción de ácido, del potencial transmembranal y tal vez propiciando que otros factores actúen cambiando intragástricamente el pH [74,98].

Los mecanismos propuestos para los efectos citoprotectores atribuidos a diferentes agentes, incluyen: estimulación del mucus y secreción alcalina, transporte de cloro o sodio, formación de AMP cíclico, fosfolípidos de superficie activa y síntesis de ADN y ARN [99], apoyan la idea de que la proliferación celular es un factor importante en la recuperación de ulceraciones duodenales y gástricas, tales como las reportadas para los factores del desarrollo epidérmicos, los cuales estimulan la síntesis de ADN, involucrando sus acciones mitogénicas y que son un factor importante en la disminución de la úlcera [74,100]. En este sentido, las células de la superficie gástrica son de vida corta, realizando un proceso continuo de restitución para la reparación de los defectos en el sitio de la exfoliación celular [74]. El pretratamiento con ácido araquidónico [101], sucralfato [102] y 16,16-dmPGE₂ [103] a animales tratados con etanol revela que preservan la zona celular de proliferación de la mucosa, la cual rápidamente restaura la integridad de la mucosa, y

resulta en la recuperación del epitelio superficial con sus barreras normales y funciones de transporte.

6.3 Modelo Molecular

No hay duda de que el mucílago tiene una gran capacidad para asociarse con el agua por la gran cantidad de hidroxilos presentes en todos los monosacáridos que constituyen la molécula, y que son capaces de interactuar favorablemente con el agua, formando puentes de hidrógeno (figuras 6 y 10), permitiendo la estabilidad molecular, como se puede determinar en las figuras 7a y 7b, dónde la energía disminuye bajo condiciones de fase acuosa.

La presencia de cargas negativas a lo largo de la cadena principal en forma esteroespecífica origina un efecto sobre la estructura, debido a que los carboxilatos ejercen un efecto de repulsión de átomos electronegativos como los oxígenos de los hidroxilos, lo que origina una tensión sobre toda la estructura, manifestado por el aumento de la energía al aumentar el número de carboxilatos en fase gaseosa (figura 7a). En condiciones de hidratación la energía disminuye al aumentar los carboxilatos (figura 7b). Esto pareciera inconsistente, pero se sabe que el agua forma asociaciones favorables con los oxígenos cargados negativamente como los carboxilatos, estas asociaciones ocurren al formarse puentes de hidrógeno (hidratación). La hidratación implica entre otras cosas una atenuación de las cargas del anión (carboxilato) y de esta forma disminuye el efecto de su carga sobre su entorno. Pero además, la asociación del carboxilato con el agua a través de puentes de hidrógeno origina una red que estructura y estabiliza la molécula, ganando de esta forma estabilidad el sistema molecular.

A su vez, el mucílago es capaz de formar asociaciones estables con iones como el Ca^{2+} , a través de establecer interacciones electrostáticas con los átomos de oxígeno de los carboxilatos, propiciando la formación de complejos que estabilizan y estructuran la molécula, originando así una disminución en la energía al aumentar el número de complejos iónicos formados (figuras 8a y 8b). Desde el punto de vista energético, ninguno de los carboxilatos es más favorable para la formación de complejos con el Ca^{2+} lo que podría indicar que no existe especificidad entre todos los sitios; estructuralmente, la esfera de ionización (figura 10) correspondió con lo observado previamente para otros poligalacturonatos [104]. Es decir, las distancias ($\bar{x}=2.33 \text{ \AA} \pm 0.86$) y la forma en la que se presentaron estos complejos correspondieron con las características determinadas con difracción de rayos X para complejos iónicos similares, donde se informan distancia de interacción de 2.1 a 2.9 \AA [105-107]. Esto podría suponer que las interacciones electrostáticas que permiten la formación de los complejos iónicos carecen de especificidad y que la asociación dependen principalmente de la distancia y oportunidad [108].

El Ca^{2+} puede ejercer un papel en la regulación de la estructura molecular y el comportamiento físico del mucílago. Existe controversia sobre la capacidad del mucílago para formar gel, la cual parece haber sido resuelta [109], con estudios sobre la reología del mucílago, los cuales indican que posee una gran capacidad elástica [110]. Sin embargo, no hay duda de la capacidad de asociación y almacenamiento de agua, así como de su capacidad para regular la viscosidad, a través de la formación de complejos iónicos entre dos o más moléculas de mucílago al formar complejos macromoleculares [104].

La estereoregularidad de los galacturonatos a lo largo de la cadena principal origina asociaciones que influyen en la conformación del mucílago, debido a que ocurre un acercamiento en parejas de galacturonatos, por efecto de la formación del complejo con el Ca^{2+} . Esta misma periodicidad puede propiciar la asociación entre dos moléculas de mucílago al permitir la formación de complejos iónicos entre dos galacturonatos, además de las interacciones por puentes de hidrógeno entre dos moléculas de mucílago, y de estas con el agua, originando así la polimerización, como ha sido propuesto previamente para otras pectinas [108].

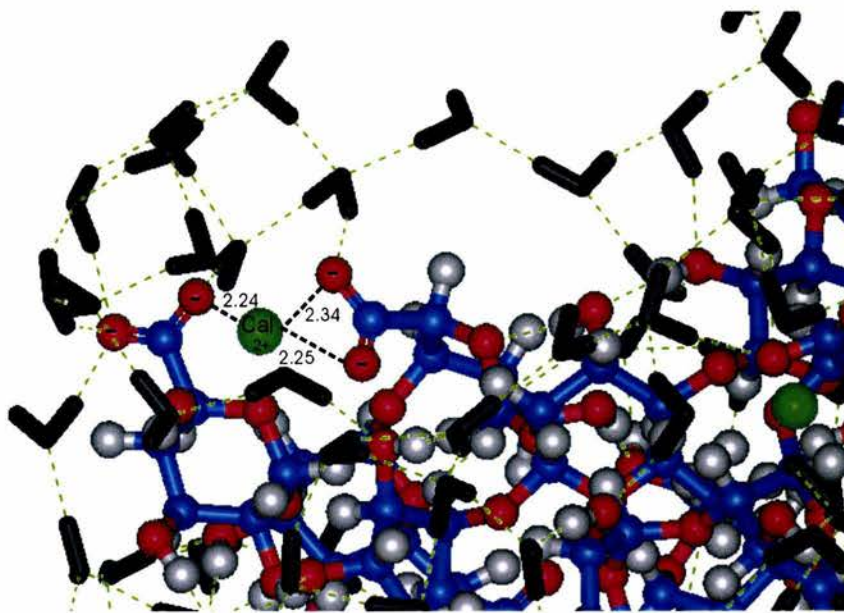


Figura 10. Amplificación de una región del mucílago que muestra la formación de un complejo iónico entre oxígenos (rojo) de dos galacturonatos y Ca^{2+} (verde). Se indica con líneas punteadas en negro las distancias interatómicas (Å) de los átomos en interacción iónica.

La inserción de ramnosa entre galacturonatos originó que la cadena principal presentará una estructura helicoidal propiciando un acortamiento y se presentaron ángulos ϕ y ψ similares a los que se ha informado para otras pectinas resueltas por

métodos teóricos y para algunas fibras de pectinas resueltas por técnicas experimentales [104]. Lo señalado, permiten suponer que el modelo desarrollado para el mucílago corresponde a las características de la molécula activa desde el punto de vista biológico.

Se ha encontrado un contenido variable de diferentes polisacáridos en plantas, semillas e invertebrados adaptados para soportar la sequía y se ha asociado esta adaptación a la capacidad de los polisacáridos para estabilizar proteínas y bicapas lipídicas. En experimentos *in vitro*, analizando efectos ante estrés hídrico por parte de la membrana, sugieren que la capacidad de los polisacáridos para estabilizar estos sistemas biológicos depende de su capacidad de asociación y control de la movilidad del agua, al formar estados denominados vítreos dónde se capturan y retienen moléculas de agua [111].

Así mismo, se demostró la interacción entre polisacáridos como la κ -carragenina [112], trealosa [30], sucrosa o fructanos [111] con las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana celular, y se propone que la interacción directa de los polisacáridos con las proteínas y cabezas de los fosfolípidos por sí misma, contribuye a evitar el daño originado por el estrés hídrico al reemplazar moléculas de disolvente asociadas por puentes de hidrógeno generando una barrera física y liberando en forma gradual agua [30].

Una causa importante de muerte celular bajo condiciones de sequía es la pérdida de función como barrera selectiva por parte de la membrana. Se ha demostrado que el comportamiento relacionado con el cambio de fase de gel a líquido de la membrana puede ser influido por la presencia de polisacáridos (fructanos), preservando la integridad membranal, y permitiendo que la fase de transición se mantenga dentro del intervalo de

actividad biológica [11]. La interacción entre el mucílago y la capa de fosfolípidos, correspondió con lo observado para otros polisacáridos (fructanos) en los cuales se ha determinado que penetran las membranas lipídicas, al insertarse entre las cabezas de los fosfolípidos formando complejos densamente empaquetados. Este fenómeno, origina interacciones iónicas entre las cargas formales positivas de las aminas cuaternarias ubicadas en las cabezas de los fosfolípidos y las negativas de los carboxilatos de los galacturonatos como ocurrió con el mucílago. Es de esperarse que el mucílago cumpla lo demostrado para otros polisacáridos (κ -carrageninas, fructanos, trealosa y sucrosa), teniendo un efecto importante sobre las propiedades de la membrana celular, estabilizando la fase de líquido-cristal, generando de esta forma un efecto protector contra la sequía, temperaturas bajas en las plantas o deshidratación por efecto del etanol, variaciones en el pH en el caso del presente trabajo donde se estudia el epitelio estomacal.

Cuando ocurre la formación de complejos polisacarido-fosfolípidos se origina una barrera capaz de impedir la interacción de la membrana con otras moléculas, tales como proteínas, al presentarse impedimento estérico entre las proteínas con los fosfolípidos de membrana [11]. Este mismo proceso puede explicar la capacidad terapéutica del mucílago, dónde el mucílago forma un complejo con los fosfolípidos, muy estable que puede actuar como una barrera contra agentes nocivos (pepsina), de igual forma como ha sido demostrado en la ribonucleasa B pancreática bovina la cual en asociación con sacáridos (glicános) disminuye su flexibilidad y aumenta su resistencia, a través de la acción de los sacáridos generando un "campo estérico" a los sitios de catálisis de las proteasas [113]. De esta forma, se puede evitar que la membrana del epitelio estomacal

de los sujetos con lesiones producto de la administración de etanol, esté en contacto con agentes nocivos que regularmente son secretados al estómago, originando que el proceso curativo se acelere, particularmente la restauración del epitelio estomacal.

7. CONCLUSIONES

Con la administración de etanol fue posible originar gastritis subcrónica en forma consistente y detectable con los análisis histológico y bioquímico en los sujetos tratados.

Las evidencias histológicas consistieron en alteraciones de la superficie epitelial, edema de la submucosa en grado variable, caracterizado por la presencia de neutrófilos. Los sujetos que recibieron mucílago, manifestaron una restauración más rápida en todos estos parámetros (aproximadamente un 41%), destacando la disminución en el número de neutrófilos respecto de los sujetos que no recibieron mucílago (72 hrs).

Los hallazgos bioquímicos más relevantes fueron: un incremento en el contenido de colesterol, alteración en la relación de especies de fosfolípidos y alteración en la relación colesterol/fosfolípidos, esta información indica claramente que la fluidez de la membrana disminuyó por efecto del etanol; con el análisis de las enzimas alcohol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa se detectaron alteraciones en el citoplasma, que en el caso de alcohol deshidrogenasa, consistieron en una disminución en su actividad.

La aplicación del mucílago revirtió estas alteraciones, particularmente la relación colesterol/fosfolípidos, la cual prácticamente se normalizó a las 72 hrs. Por su parte los niveles de alcohol deshidrogenasa alcanzaron la condición normal desde las 48 hrs. La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa se modificó por el tratamiento; sin embargo, la gastritis, más que el tratamiento con el mucílago indujo cambios en la actividad específica de esta enzima.

Con un modelo molecular del mucílago fue posible determinar los tipos de interacciones moleculares que estabilizan a esta macromolécula, siendo muy importantes los puentes de hidrógeno intramoleculares y entre el mucílago y moléculas de agua, así

como interacciones iónicas entre los galacturonatos con iones de calcio (o magnesio) al formar complejos iónicos. La interacción entre el modelo molecular del mucílago y los fosfolípidos de membrana indicó una asociación favorable, fuerte y muy estable entre ambas macromoléculas.

En conclusión, el mucílago aceleró la restauración a la condición normal a partir de las alteraciones estructurales y funcionales, generadas durante la gastritis alcohólica. El efecto terapéutico puede deberse a que ocurre una asociación favorable con el epitelio estomacal, específicamente con proteínas glicosiladas como las mucínas o directamente con los fosfolípidos, recubriendo la membrana epitelial, evitando daño recurrente por la pepsina y HCl, acelerando la regeneración de la mucosa gástrica.

8. REFERENCIAS

1. Bravo H. 1978. Las cactáceas de México, Vol. I y II. Editorial UNAM, México, D.F..
2. Anzures, M. 1983. La medicina tradicional en México. Editorial UNAM. 214 p. México, D.F.
3. Grierson D. y Afolayan A. 1999. An ethnobotanical study of plants used for the treatment of wounds in the Eastern Cape, South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, 67: 327-332.
4. Meyer N. y McLaughlin J. 1981. Economic uses of *Opuntia*. *Cactus Succulent J. (US)*, 53:107-112.
5. Morton J. 1990. Mucilaginous plants and their uses in medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 29:245-266.
6. Ahmad A., Davies J., Randall S. y Skinner G. 1996. Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Res.*, 30:75-85.
7. Park E. y Peak E. 1998. Studies on the pharmacological action of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Arch. Pharm. Res.*, 21:30-34.
8. McGarvie D. y Parolis, H. 1979. The mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydr. Res.*, 69: 171-179.
9. Voet D. y Voet J. 1992. *Biochemistry*. John Wiley and Sons. New York, 1315 p.
10. Alger M. 1997. *Polymer science dictionary*. 2ª ed. Mark-Hall (eds.). EUA, pp. 327.
11. Ryden P., MacDougall A., Tibbits C., Ring S. 2000. Hydration of pectic polysaccharides. *Biopolymers*, 54:398-405.
12. Majdoub H., Roudesli S., Picton L., Le Cerf, D., Muller G. y Grises M. 2001. Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physico-chemical study in dilute and semi-dilute solutions. *Carbohydr. Polymers*, 46: 69-79).
13. Sands L. y Klaas, R. 1929. The composition of cholla gum I. The isolation of L-arabinose, D-galactose and L-rhamnose. *J. Am. Chem. Soc.*, 51:3441-3450.
14. Andrews P., Ball D. y Jones J. 1953. The isolation of oligosaccharides from gums and mucilages. Part I. *J. Chem. Soc.*:4090-4095.
15. Srivastava B. y Pande C. 1974. Arabinogalactan from the pods of *Opuntia dillenii*. *Planta Med.*, 25:92-97.
16. Moyna P. y Tubio R. 1978. Mucilages in succulent plants. *Planta Med.*, 34:201-205.

17. McGarvie D. y Haralampos P. 1979a. The mucilage of *O. ficus-indica*. Carbohydr. Res., 69:171-179
18. McGarvie D. y Haralampos P. 1979b. The mucilage of *O. ficus-indica*, part 2: The degraded polysaccharide. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I. 1979:1464-1466.
19. McGarvie D., Haralampos P. 1981. The mucilage of *O. auracanta*. Carbohydr. Res. 69:171-179.
20. McGarvie D. y Parolis H. 1981. Methylation of the mucilage of *O. ficus-indica*. Carbohydr. Res., 94:54-65.
21. McGarvie D. y Parolis H. 1981. The acid-labile, peripheral chains of the mucilage of *O. ficus-indica*. Carbohydr. Res., 94:54-65.
22. Trachtentberg S. y Mayer A. 1981. Composition and properties of *Opuntia ficus-indica*. Phytochem., 20:2665-2668.
23. Trachtenberg S. y Mayer A. 1982. Biophysical properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. Phytochem., 21:2835-2843
24. Medina-Torres L., Brito de la Fuente E., Torrestiana-Sánchez B. y Katthain R. 2000. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). Food Hydrocoll., 14:417-424.
25. Sáenz, C., Sepúlveda E. y Matsushiro B. 2003. *Opuntia spp.* Mucilages's: a functional component with industrial perspectives. J. Arid. Environ. (en prensa)].
26. Chang R. 1998. Química. Editorial McGraw-Hill, México, 1065 p.
27. Braccini I., Grasso R. y Pérez S. 1999. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. Carbohydr. Res., 317:119-130.
28. Cramer C. y Truhlar D. 1994. Structure and Reactivity in Aqueous Solution. Characterization of Chemical and Biological Systems. ACS Symposium Series. Washington, pag. 438.
29. www.rcsb.org
30. Qiang L., Schmidt R., Teo B., Karplus P. y Brady J. 1997. Molecular dynamics studies of the hydration of α,α -trehalose. J. Am. Chem. Soc., 119:7851-7862.

31. Batta G., Kover K., Gervay J., Hornyak M. y Roberts G. 1997. Temperature dependence of molecular conformation, dynamics, and chemical shift anisotropy of α,α -trehalose in D₂O by NMR relaxation. *J. Am. Chem. Soc.* 119:1336-1345
32. Pérez S., Mazeau K., Hervé du Penhoat C. 2000. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.*, 38:37-55.
33. Villalobos J. 1982. *Gastroenterología*. Editorial Mendez-Oteo, 2ª edición. México pág. 477-498.
34. Hernández-Muñoz R., Montiel-Ruíz, F. 1996. Reversion by histamine H₂-receptor antagonists of plasma membrane alterations in ethanol-induced gastritis. *Dig. Dis. Sci.*, 41:2156-2165.
35. Holt K. y Hollander D. 1986. Acute gastric mucosal injury: pathogenesis and therapy. *Ann. Rev. Med.*, 37:107-124.
36. Kraut J., Starr F., Sachs G. y Reuben M. 1995. Expression of gastric and colonic H(+)-K(+)-ATPase in the rat kidney. *Am. J. Physiol*, 268 (4 Pt 2):F581-587.
37. Lichtenberg L. 1995. The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Annu. Rev. Physiol.* 57:565-583.
38. Parke D. 1976. Gastric mucus and carbenoxolone. En: Tuelove S., Ritchie J. editores. *Topics in Gastroenterology*, 4th edición. Oxford, Blackwell: 329-343.
39. Basil R., Stanley E. y LaMont T. 1995. Mucin biophysics. *Annu. Rev. Physiol.* 57:635-657.
40. Younan P., Pearson J., Allen A. y Venables O. 1982. Changes in the structure of the mucus gel on the mucosal surface of the stomach in association with peptic ulcer disease. *Gastroenterol.*, 82:827-831.
41. Domschke W., Domschke S. y Demling L. 1977. Defective "lines of defense" in gastric ulceration. *Acta Hepato-Gastroenterol.*, 24:129-130.
42. Slomiany A., Slomiany B. y Horowitz M., 1975. Studies on changes in lipid profiles of the rat gastric mucosa with stress ulcers. *Clin. Chim. Acta* 59:215-226.
43. Guth P., Paulsen G. y Nagata H. 1984. Histological and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: Effect of prostaglandin cytoprotection. *Gastroenterol.*, 87:1083-1090.

44. Wassef M., Lin Y. y Horowitz M. 1979. Molecular species of phosphatidyl choline from rat gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 573:222-226.
45. Nakamura J. 1994. Effect of short-term and long-term alcohol intake on plasma cholesterol in non-alcohol humans. *Clin. Chim. Acta*, 224:107-109.
46. Szabo S. 1991. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. *J. Clin. Gastroenterol.* 13 (suppl 2):S21-S34.
47. Montandon D., D'Adiran G. y Gabbiani G. 1977. The mechanism of wound contraction and epithelialization. *Clin. Plast. Surg.*, 4:325-346.
48. Robert A., Nezamis J., Lancaster C. y Hanchar A. 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterol.*, 77:433-443.
49. Inauen W., Wyss, P., Kayser S., Baumgartner A., Schürer-Maly C., Koelz H. y Halter F. 1988. Influence of prostaglandins, omeprazole and indomethacin on healing of experimental gastric ulcers in the rat. *Gastroenterol.*, 95:636-641.
50. Tarnawski A., Hollander D., Gegerly H. y Stachura J. 1985. Comparison of antacid, sucralfate, cimetidine and ranitidine in protection of the gastric mucosa against ethanol injury. *Am. J. Med.*, 79 (suppl. 2C):19-22.
51. Konturek S., Radecki T., Brzozowski T., Piastucki I., Dembinki A., Dembinki A., Dembinska-Kiec A., Zmuda A., Gryglewski R. y Gregory H. 1981. Gastric cytoprotection by epidermal growth factor. Role on endogenous prostaglandins and DNA synthesis. *Gastroenterol.*, 81:438-443.
52. Wallace J. y Whittle B. 1986. Profile of gastrointestinal damage induced by platelet-activating factor. *Prostaglandins*, 32:137-141.
53. Kauffman G. The gastric mucosal barrier, component control. *Dig. Dis. Sci.*, 30(11) supl:55-60.
54. Voelker D. 1991. Organelle biogenesis and intracellular lipid transport in eukaryotes. *Microbiol. Rev.*, 55:543-560.
55. Nardone G., D'Armiento F., Corso G., Coscione P., Esposito M. y Budillon G. Lipids of human gastric mucosa: effect of *Helicobacter pylori* infection and nonalcoholic cirrhosis. 1988. *Gastroenterol.*, 94:10-21.

56. Kennedy N. y Tripton K. 1990. Ethanol metabolism and alcoholic liver disease. *Essays Biochem.*, 12:138-195.
57. Morales-González, J. 2001. Papel de la alcohol deshidrogenasa (ADH) en la farmacocinética del etanol durante la regeneración hepática y los efectos morfológicos y bioquímicos de la administración aguda de etanol. Tesis de Doctorado, México, UNAM, pp 7-15.
58. Carda-Abella P., Pérez-Cuadrado S. y Mate-Jimenez J. 1978. LDH isoenzyme patterns in human gastric mucosa with precancerous changes. *Cancer*, 42:490-494.
59. Vassault A. 1983. Lactate dehydrogenase. UV-method with piruvate and NADH. En: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3. J. Bergmeyer M, Grabl (eds). Derfield Beach, Florida, Verlag-Chemie, 1983, pp 119-126.
60. Britton N., Rose J. *The Cactaceae*. Ed. Dover Publications, Inc. Nueva York, EUA. Vol. I-II.
61. Loten E. y Redshaw-Loten J. 1986. Preparation of rat liver plasma membranes in a high yield. *Anal. Biochem.* 154:183-185.
62. García-Saínez J. y Fain J. 1980. Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism in isolates white fat cells. *Biochem. J.* 186:781-789.
63. Caballería J., Baraona E., Romadilans M. y Lieber C. 1989. Effects of cimetidine on gastric alcohol dehydrogenase activity and blood ethanol levels. *Gastroenterol.*, 96:388-392.
64. Lowry O., Rosebrough N. y Farr A., Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
65. Lamba D., Fabrizi G. y Matsuhiro B. 1994. Methyl- α -D-galacturonic acid methyl ester. *Acta Crystallogr.* C50:1494-1497.
66. Arnott S., Fulmet A., Scott W., Dear I., Moorhouse R. y Rees. D. 1974. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J. Mol. Biol.*, 90:269. 1AGA.
67. Takagi, S. y Jeffrey G. 1978. A neutron diffraction refinement of the crystal structure of L-rhamnose monohydrate. *Acta Crystallogr.* B34:2551-2555.
68. Sabini E., Sulzenbacher G., Dauter M., Dauter Z., Jorgensen P., Shulein M., Dupont C., Davies G y Wilson K. 1999. Catalysis and specificity in enzymatic glycoside

- hydrolysis: a 2,5b conformation for the glycosyl-enzyme intermediate revealed by the structure of the bacillus agaradhaerens family 11 xylanase. *Chem. Biol.*, 7:483. 1QH7.
69. Spartan version 5.1. 1998. Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman Ave., 370, Irvine, CA 92715, EUA. Wavefunction Inc.
70. Cramer C y Truhlar D. 1992. An SCF salvation model for the hydrophobic effect and absolute free energies of aqueous salvation. *Science*, 256:213-217.
71. Heller H., Schaefer M. y Schulten S. 1993. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel an in the lipid-crystal phases. *J. Phys. Chem*, 97:8343-8360.
72. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. Ed. Omega. Barcelona, pag. 514-516.
73. InsightII, versión 1995. Biosym/MSI. 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752.
74. Konturek S., Radecki T., Brzozowski T., Piastucki I., Dembinska-Kiec A. y Zmuda A. 1981. Gastric cytoprotection by prostaglandins, ranitidine, and probanthine in rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 16:7-12.
75. Lacy E. e Ito S. 1982. Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. *Gastroeneterol.*, 83:619-625.
76. Galati E., Monforte M., Tripodo M., d'Aquino A. y Mondillo M. 2001. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill (Cactaceae): ultraestructural study. *J. Ethnopharmacol.*, 76:1-9.
77. Dixon M., Genta R., Yardley J. y Correa P. 1996. Classification and grading of gastritis. *J. Surg. Path.*, 20:1161-1181.
78. Ohno T., Ohtsuki H. y Okabe S. 1985. Effects of 16,16-dimethyl prostaglandin E₂ on ethanol-induced and aspirin-induced gastric damage in the rat. *Gastroenterol.*, 88:353-361.
79. Deregnaucourt J. y Code C. 1979. Increased resistance of the gastric mucosal barrier to barrier breakers in the rat. *Grastroenterol.*, 77:309-312.
80. Biggerstaff R. y Leitch G. 1977. Effect of ethanol on electrical parameters of the in vivo rat stomach. *Dig. Dis. Sci.*, 22:1064-1068.
81. Sernka T., Gilleland C. y Shanbour L. 1974. Effects of ethanol on active transport in the dog stomach. *Am. J. Physiol.*, 226:397-400.

82. Oates P. y Hakkinen, J. 1988. Studies on the mechanism of ethanol induced gastric damage in rats. *Gastroenterol.*, 94:10-21.
83. Guth P., Paulsen G. y Nagata H. 1984. Histological and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: Effect of prostaglandin cytoprotection. *Gastroenterol.*, 87:1083-1090.
84. Van Blitterswijk W., Wan Howven R. y Van der Meer B. 1981. Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim. Biophys. Acta*, 644:323-332.
85. Incerpi S., Jefferson J., Wood W., Ball W. y Schroeder F. 1992. Na⁺ pump and plasma membrane structure in L-cell fibroblasts expressing rat liver fatty acid binding protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298:35-42.
86. Hernández-Muñoz R., Díaz-Muñoz M. y Chagoya de Sánchez V. 1992. Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 294:160-167.
87. Daveloose D., Linard A., Arfi T., Viret J., Christon R. 1993. Simultaneous changes in lipid composition, fluidity and enzyme activity in piglets intestinal brush border membrane as affected by dietary polyunsaturated fatty acid deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, 1166:229-237.
88. Wassef M., Lin Y. y Horowitz M. 1978. Phospholipid-deacylating enzymes of rat stomach mucosa. *Biochim. Biophys. Acta*, 528:318-330.
89. Wallace J. y Whittle B. 1986. Profile of gastrointestinal damage induced by platelet-activating factor. *Prostaglandins*, 32:137-141.
90. Maksem J., Jacobson N. y Neidershiser D. 1984. Lysophosphatidylcholine-induced gastric injury and ulceration in the guinea pig. *Am. J. Pathol.*, 115:288-295.
91. Little M., McCarthy C., Mooney P. y Walters K. 1977. The relationship between gastritis and the effect of bile salts on Na, K-ATPase in human gastric mucosa. *J. Physiol. (Lond.)*, 273:61P-62P.
92. Lichtenber L., Graziani L., Dial E., Butler B. y Hills B. 1983. Role of surface-active phospholipids in gastric cytoprotection. *Science*, 219:1327-1329.

93. Miller T. 1983. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage. Current knowledge and proposed mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 245:G601-G623.
94. Ramasamy S., Boissonneault G. y Henning B. 1992. Oxysterol-induced endothelial cell dysfunction in culture. *J. Am. Coll. Nutr.*, 11:532-538.
95. Thuvulath P., Wojno K., Yardley J. y Mezey E. 1994. Effects of *Helicobacter pylori* infection and gastritis on gastric alcohol dehydrogenase activity. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18:795-798.
96. Baraona E., Yokoyama A., Ishii H., Hernández-Muñoz R, Takagi T., Tsuchiya M. y Lieber C. 1991. Lack of alcohol dehydrogenase isoenzyme activities in the stomach of japanese subjects. *Life Sci.*, 49:1929-1934.
97. Seitz H., Veith S., Czygan P., Börsche J., Simon B., Gugler R. y Kommerell B. 1984. In vivo interactions between H₂-receptor antagonists and ethanol metabolism in man and in rats. *Hepatology*, 4:1231-1234.
98. Ivey K. y Mackercher P. 1978. Effect of cimetidine on ion fluxes and potential difference across the human stomach. *Gut*, 19:414-418.
99. Silen W. 1988. What is cytoprotection of the gastric mucosa?. *Gastroenterol.*, 94:232-235.
100. Konturek S., Dembinski A., Warzecha Z., Brzozowski T. y Gregory H. 1988. Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats. *Gastroenterol.*, 94:1300-1307.
101. Tarnawski A., Hollander D., Stachura J. y Krause W. 1983. Arachidonic acid protection of gastric mucosa against alcohol injury: Sequential analysis of morphologic and functional changes. *J. Lab. Clin. Med.*, 102:340-351.
102. Hollander D., Tarnawski A., Krause W. y Gergely H. 1985. Protective effect of sucralfate against alcohol-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterol.*, 88:366-374.
103. Tarnawski A., Hollander D., Stachura J., Krause W. y Gergely H. 1985. Prostaglandin protection of the gastric mucosa against alcohol injury. A dynamic time-related process. *Gastroenterol.*, 88:334-352.
104. Pérez S., Mazeau K. y Hervé du Penhoat C. 2000. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.* 38:37-55.

105. Huber R., Berendes R., Burger A., Schneider M., Karshikov A., Luecke H., Romisch J. y Paques E. 1992. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J. Mol. Biol.*, 223: 683. 1SAV.
106. Swairjo M., Concha N., Kaetzel M., Dedman J. y Seaton B. 1995. Ca⁽²⁺⁾-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Biol.* 2:968 (1995). 1A8A.
107. Prabu M., Sankaranarayanan R., Puri K., Sharma V., Surolia A., Vijayan M. y Suguna K.. 1998. Carbohydrate specificity and quaternary association in basic winged bean lectin: X-ray analysis of the lectin at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 276:787 1WBL.
108. Braccini I., Grasso R. y Pérez S. 1999. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydr. Res.*, 317:119-130.
109. Medina-Torres L., Brito-De La Fuente E., Torrestiana-Sánchez B. y Alonso S. 2003. Mechanical properties of gels formed by mixtures of mucilage gum (*Opuntia ficus-indica*) and carrageenans. *Carbohydr. Polymers*, 52:143-150.
110. Medina-Torres L., Brito-De La Fuente E., Torrestiana-Sánchez B. y Kathain R. 2000. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus-indica*). *Food Hydrocol.*, 14:414-424.
111. Vereyken I., Chupin V., Demel R., Smeekens C. y De Kruijff B. 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1510:307-320.
112. Girod S., Cara I., Maillois H., Salles J. y Devoisselle J. 2001. Relationship between conformation of polysaccharides in the dilute regime and their interaction with a phospholipid bilayer. *Luminescence*, 16:109-116.
113. Rudd P., Joao H, Coghil, E., Fiten P., Saunders M., Opdenakker G. y Dwek R. 1994. Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme. *Biochem.*, 33:17-22.